

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní obor: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní program: Molekulární biologie a biochemie organismů



Michal Knězů

Struktura a funkce P2X receptorů aktivovaných extracelulárním ATP

Structure and function of P2X receptors activated by extracellular ATP

Bakalářská práce

Školitel: RNDr Hana Zemková, CSc.

Praha, 2020

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze,

.....

Michal Knězů

Poděkování:

Rád bych poděkoval své školitelce RNDr Haně Zemkové, CSc a zbytku osazenstva laboratoře molekulární a buněčné neuroendokrinologie za cenné vhledy a dobré rady týkající se mé práce.

Abstrakt

ATP hraje důležitou roli v mezibuněčné signalizaci v mnoha tkáních eukaryot. P2X receptory jsou jedním z typů ligandem-aktivovaných iontových kanálů, jejichž přirozeným ligandem je právě ATP, a jsou zodpovědné za množství fyziologických funkcí v organismech. V posledních 11 letech se objevilo několik studií zabývajících se krystalizací P2X receptorů a jejich strukturou. Tyto studie objasnily mnoho fenoménů týkajících se vlastností P2X receptorů, například vazbu ligandu, některé typy modulace, charakter samotného iontového kanálu, který P2X receptory tvoří, a hlavně jeho celkovou strukturu i se strukturními specifiky pro konkrétní P2X podtypy. Studie například vysvětlují důvody desenzitizace, mechanismus otevírání iontového kanálu a konformační změny související s vazbou ligandu, které otevírání předcházejí. Cílem této práce je přinést přehled poznatků o známých strukturách P2X receptorů a nahlédnout do funkčních vlastností jejich specifik.

Klíčová slova:

P2X receptor, purinergní signalizace, ATP, iontový kanál, krystalová struktura

Abstract

ATP plays an important role in cellular signaling in many eukaryotic tissues. P2X receptors belong to a family of ligand-gated ion channels with ATP as naturally occurring ligand. They are responsible for many different physiological functions in organisms. There are several studies published in last 11 years about crystalization and structure of P2X receptors. These studies shed light on many phenomena regarding P2X receptors such as ligand binding, several types of modulation, characterization of P2X ion channel and mainly the overall structure of P2X receptors and unique structural elements of different P2X subtypes. These studies also help to explain reasons of P2X receptor desensitization, mechanism of ion channel opening and conformational changes induced by ligand binding, a prerequisite of channel opening. The aim of this work is to summarize current knowledge about structures of P2X receptors.

Key words:

P2X receptor, purinergic signaling, ATP, ion channel, crystal structure

Seznam zkratk

ATP - adenosin-5' trifosfát

ADP - adenosin-5' difosfát

AMP - adenosin-5' monofosfát

GTP - guanosin-5' trifosfát

GDP - guanosin-5' difosfát

UTP - Uridin-5' trifosfát

UDP - Uridin-5' difosfát

cAMP – cyklický adenosin-5' monofosfát

EC₅₀ - Koncentrace, při níž amplituda proudu dosahuje poloviny maximální amplitudy

zfp2X4 - P2X4 receptor ze zebřičky

hP2X3 - P2X3 receptor z člověka

pdP2X7 - P2X7 receptor z pandy

rP2X7 - P2X7 receptor z potkana

α,β -meATP - α,β -methylenadenosin-5' trifosfát

BzATP - 3'-O-(4-benzoyl)benzoyladenosin-5'-trifosfátu

NMDG - N-methyl-D-asparagová kyselina

TM - transmembránová doména, zahrnuje oba transmembránové helixy

TM1 - transmembránový helix 1

TM2 - transmembránový helix 2

TNP-ATP - 2',3'-O-(2,4,6-trinitrofenyl)-adenosin-5'-trifosfát

PPADS - pyridoxalfosfát-6-azofenyl-2',4'-disulfonová kyselina

Označení aminokyselin

Aminokyselina	Troj písmenná zkratka	Jedno písmenná zkratka
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Aspartát	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamát	Glu	E
Glutamin	Gln	Q
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Fenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptofan	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	Val	V

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Purinergní signalizace	2
3. Známé krystalové struktury P2X receptorů	3
3. 1. P2X4.....	3
3. 1. 1. Konstrukty P2X4 použité pro krystalizaci	4
3. 1. 2. Celková struktura trimerního	5
3. 1. 3. Struktura podjednotky.....	6
3. 1. 4. Uzavřený stav kanálu	8
3. 1. 5. Způsob průchodu iontů	8
3. 1. 6. Iontová selektivita	9
3. 1. 8. ATP vazebné místo	10
3. 1. 9 Otevřený stav kanálu.....	12
3. 1. 10. Účinek antagonistů.....	13
3. 2. P2X3.....	14
3. 2. 1. Konstrukty použité pro krystalizaci	14
3. 2. 2. Všeobecná struktura	15
3. 2. 3. Nově objevené nebo unikátní strukturní a funkční prvky.....	15
3. 2. 4. Stavy hP2X3 receptoru a přechody mezi nimi.....	16
3. 2. 5. Způsob průchodu iontů	18
3. 2. 6. Vazba a efekt antagonistů.....	19
3. 3. P2X7.....	20
3. 3. 1. Konstrukty P2X7 použité pro krystalizaci	21
3. 3. 2. Všeobecná struktura	21
3. 3. 3. Objevené nové strukturní a funkční prvky v cytoplasmatické části a v její blízkost.....	22
3. 3. 4. Další významné prvky P2X7 receptoru	25
3. 3. 5. způsob průchodu iontů	27
3. 3. 6. ATP vazebné místo	27
3. 3. 7. Způsob efektu antagonistů	27
4. Závěr	28
5. Bibliografie	29

1. Úvod

Adenosin 5'-trifosfát (ATP) byl dlouhou dobu považován za molekulu sloužící k čistě energetickému metabolismu, ovšem posléze byla roku 1972 Geoffreyem Burnstockem navržena i jeho role v signalizaci, která byla následně i potvrzena (Burnstock & Verkhratsky, 2012). Vně buňky se ATP velmi rychle mění na ADP, následně na AMP a posléze až na samotný adenosin. Signalizace, nazývaná purinergní, využívá ATP (ale i jiné podobné molekuly) jako molekuly ligandu vázajícího se na receptor. Purinergní receptory se nacházejí v membránách mnoha typů buněk savců, ale i jiných obratlovců a i bezobratlých. Jsou známě purinergní receptory tří typů – P1, P2X a P2Y. Tato práce se zaměřuje na molekulární strukturu receptorů typu P2X, jejichž přirozeným ligandem je právě ATP (Abbracchio, Burnstock, Verkhratsky, & Zimmermann, 2009).

P2X receptory slouží k mnoha fyziologickým procesům, hrají roli například ve vnímání bolesti a chuti, modulují signalizaci na nervových synapsích, ovlivňují stah hladkého svalu, souvisí s aktivací krevních destiček, mají své místo v signalizaci zánětlivých reakcí, jako je například produkce a uvolňování interleukinu β v makrofázích, a v signálních drahách programované buněčné smrti. Dále jsou P2X receptory důležité pro regulaci krevního tlaku, dilataci a konstrikci cév a průtok krve oční retinou (Souslova et al., 2000) (Finger et al., 2005) (Cook, Vulchanova, Hargreaves, Elde, & McCleskey, 1997) (Kopp, Krautloher, Ramírez-Fernández, & Nicke, 2019). P2X receptory po aktivaci tvoří pór pro kationty. Některými typy P2X receptorů mohou procházet i velké molekuly organických kationtů, jako je například N-methyl-D-asparagová kyselina (NMDG) nebo fluorescenční barvivo YO-PRO-1 (North, 2002).

Lidský P2X receptor má sedm typů podjednotek (P2X1-7), které se sestavují do trimerních komplexů na membránách různých buněčných typů. Tyto komplexy mohou být homomerní, pokud jsou tvořeny jen jedním typem podjednotek, nebo heteromerní, pokud jsou tvořeny více typy P2X podjednotek. Struktura všech sedmi podjednotek je topologicky velmi podobná a sestává se z intracelulárního C-konce, transmembránového α -helixu, extracelulární části složené z volných řetězců a β -listů, dalšího transmembránového α -helixu a interacelulárního N-konce (North, 2002).

Počet prací věnovaných farmakologii a struktuře purinergních P2X receptorů stále stoupá, Specifičtí antagonisté, kteří by případně mohly být v budoucnosti využiti například při léčbě chronické bolesti nebo zánětlivých onemocnění. Chyby v signalizaci zprostředkované P2X receptory, obzvláště pak P2X7 receptorem, jsou spojovány kupříkladu s rakovinovým bujením a jeho vznikem. Výzkum struktury P2X receptorů pomáhá porozumět jejich funkci v organismu a jejich modulaci různými látkami, což může být využito k výše zmíněným účelům (Kopp et al.,

2019). Cílem této práce je shrnout dosavadní znalosti a vědomosti o struktuře těchto receptorů a jejich funkci na molekulární úrovni.

2. Purinergní signalizace

Jako bylo výše zmíněno, roku 1972 bylo představen první koncept purinergní signalizace mezi buňkami. Purinergní signalizace spočívá v přenosu informace za pomoci extracelulárního ATP, ADP, AMP a od nich odvozených sloučenin nebo podobných látek (Abbracchio et al., 2009). ATP a jemu podobné látky sloužící v purinergní signalizaci se do mezibuněčného prostoru mohou dostávat několika způsoby. Prvním ze způsobů je fyzickým poškozením buňky, při němž se obsah cytoplasmy vylije do mezibuněčného prostoru, kde může sloužit k signalizaci. Dalším ze způsobů je vyloučením z buněk, například pomocí kanálů, jako je panexin nebo konexin, nebo za pomoci transportérů, nebo přes exocytózu. Na některých vnitrobuněčných kompartmentů, jakými mohou být kupříkladu synaptické váčky nebo endolysosomy, se nachází vesikulární nukleotidový transportér (Cl⁻ dependent vesicular nucleotide transporter, VNUT), který je schopen přenášet ATP, ale také ADP nebo GDP, do váček, jejichž následnou fúzí s plasmatickou membránou dojde k vyloučení těchto molekul do mezibuněčného prostoru (Sawada et al., 2008). Další způsob, jakým může dojít k přítomnosti ligandu purinergních receptorů v mezibuněčném prostoru, je přeměnou látek, které se zde již nacházejí. Vylučované nukleotidy jsou totiž v extracelulárním prostředí rychle degradovány pomocí ektonukleotidáz a produkty této degradace mohou sloužit jako ligandy dalších receptorů. Mezi ektonukleotidázy, které jsou exprimované v mozku, patří například ektonukleosid trifosfát difosfohydrolázy nebo ektonukleosid pyrofosfatázy a fosfodiesterázy, alkalická fosfatázy a ekto-5'-nukleotidázy. Tyto enzymy vedou k rychlé přeměně ATP na ADP, následně AMP a posléze až k adenosinu. Zároveň se ovšem v extracelulárním prostoru mohou nacházet i adenylát kinázy a ektonukleosid difosfát kinázy, které naopak z výše zmíněných produktů katabolických reakcí degradace mohou opětovně vytvářet ATP (Abbracchio et al., 2009).

Mezi purinergní receptory řadíme P1 receptory a P2 receptory, které následně dále dělíme na P2X a P2Y. Receptory P1 jsou aktivované adenosinem a patří mezi receptory spřažené s G proteinem. Jsou známy čtyři typy, A₁, A_{2A}, A_{2B} a A₃, přičemž aktivace A₁ a A₃ vedou přes G_{i/o} k inhibici tvorby cAMP, zatímco A_{2A} a A_{2B} stimulují přes G_s tvorbu cAMP (Schulte & Fredholm, 2003). P2Y receptory jsou také metabotropní receptory spřažené s G proteinem. Dělí se do dvou skupin na základě aminokyselin důležitých při vazbě ligandu, fylogenetických podobností a vazbou rozdílných G proteinů. První skupina obsahuje P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ a P2Y₁₁ receptory, které slouží k aktivaci fosfolipázy C a vylučování Ca²⁺ z endoplasmatického retikula přes G_q a G₁₁

proteiny. Druhá skupina P2Y receptorů obsahuje P2Y₁₂, P2Y₁₃ a P2Y₁₄, které slouží k inhibici adenylát cyklázy přes G_{i/o}. Ligandů P2Y receptorů je několik a ne každý receptor je citlivý ke všem. Mezi ligandy P2Y receptorů patří ATP, ADP, UTP, UDP, UDP glukóza, UDP galaktóza, NAD⁺ a NAADP⁺ (Abbracchio et al., 2009). Poslední skupinou purinergních receptorů jsou P2X receptory, které fungují jako ligandem aktivované iontové kanály. U savců bylo identifikováno sedm podtypů P2X receptorů označovaných P2X1-7. Podtypy se liší délkou aminokyselinového řetězce (od 379 aminokyselin u receptoru P2X6 po 595 aminokyselin u receptoru P2X), umístěním v buňce (P2X5 a P2X6 nevystupují na cytoplasmatickou membránu, ale zůstávají v endoplasmatickém retikulu), citlivostí k ATP a jiným agonistům [např. P2X1 a P2X3 receptory jsou citlivé k α,β -methylenadenosin-5' trifosfátu (α,β -meATP), P2X7 receptor k 3'-O-(4-benzoyl)benzoyladenosin-5'-trifosfátu (BzATP)] a antagonistům, kinetikou a průběhem odpovědi na podnět i reakcí na různé modulační látky (North, 2002).

3. Známé krystalové struktury P2X receptorů

Nejzásadnější pro poznání molekulární struktury a funkce P2X receptorů jsou jejich krystalové struktury. Prozatím byly vyřešeny krystalové struktury homomerních trimerů podjednotek tří podtypů P2X receptorů: P2X4 (Kawate, Michel, Birdsong, & Gouaux, 2009) (Hattori & Gouaux, 2012), P2X3 (Mansoor et al., 2016) a P2X7 (McCarthy, Yoshioka, & Mansoor, 2019) (Karasawa & Kawate, 2016a). Všechny mají podobnou terciární strukturu do jisté míry obdobné chování v rámci změn konformace. Vazebné místo pro ligand se u všech těchto receptorů nachází na podobném místě a aminokyseliny důležité pro vazbu ligandů jsou téměř identické. Obdobné jsou také rámcové změny konformace při otevírání iontového kanálu, ač ty se mezi krystaly jednotlivých P2X receptorů v některých ohledech liší. K tvorbě těchto krystalů P2X receptorů byly kvůli snazší nebo vůbec možné krystalizaci využity upravené a/nebo zkrácené verze jejich wild typů, což ovlivnilo jejich fyziologickou a molekulární funkčnost. Mnohé rozdíly v konformačních změnách tedy mohou být vysvětlitelné na základě odlišnosti primární struktury P2X receptorů a jejich upravených variant, jež byly krystalizovány. Odlišnosti struktur krystalů P2X receptorů od skutečných wild type P2X receptorů mohou být také u některých krystalů způsobeny vlivem absence přirozeného prostředí plasmatické membrány, o němž je známo, že na něm funkce a funkčnost P2X receptorů také závisí. Cílem této bakalářské práce je porovnat struktury dosud krystalizovaných P2X receptorů, které zde budou rozebírány v chronologicky dle toho, jak byly objeveny.

3. 1. P2X4

Jak bylo výše zmíněno, stejně jako pro ostatní P2X receptory, je přirozeným ligandem P2X4 receptoru ATP. Strukturně a do jisté míry i funkčně je tento receptor nejpodobnější P2X7 receptoru. Jedná se o receptor s středně rychlou desenzitizací. Koncentrace, která vyvolá polovinu maximální odpovědi (EC_{50}), leží mezi 1 až 10 μ M ATP, čímž se zásadně liší od P2X7. Dále je známo, že P2X4 receptor je potencován ivermektinem, který mimo jiné zpomaluje desenzitizaci, nebo například zinkem. Na rozdíl od ostatních P2X receptorů je poměrně necitlivý k suraminu nebo k pyridoxalfosfát-6-azofenyl-2',4'-disulfonové kyselině (PPADS), je však inhibován nízkým pH (North, 2002) (Stoop, Surprenant, & North, 1997) (Wildman, King, & Burnstock, 1999a) (Xiong et al., 1999) (Schmid & Evans, 2019).

P2X4 receptory se nachází u mnoha různých typů buněk, je možné je nalézt v gliových buňkách nebo v neuronech a nachází se například v hippocampu, v neuronech retinálního ganglionu, v supraoptických neuronech, v periferních gangliích, v hypothalamu nebo v cerebellu (Collo et al., 1996) (Wheeler-Schilling, Marquardt, Kohler, Guenther, & Jabs, 2001) (Shibuya et al., 1999) (North, 2002) (Buell, Lewis, Collo, North, & Surprenant, 1996) (Luo et al., 2006) (Alejandro, Paloma, Carlos Matute, & Maria Domercq, 2020) (Vavra, Bhattacharya, & Zemkova, 2011) (Anirban Bhattacharya et al., 2013). Na rozdíl od ostatních P2X receptorů může ovšem být P2X4 receptor i intracelulárně, konkrétně na endolyzosomálních membránách, kde je jeho jinak extracelulární část orientována do lumen organely. Do lyzosomů se může dostat ATP, avšak právě kvůli výše zmíněné inhibici nízkým pH nedochází k aktivaci P2X receptoru (Murrell-Lagnado, 2018) (Schmid & Evans, 2019).

Je známo, že P2X4 receptory dokáží tvořit, stejně jako některé jiné P2X receptory, heteromerní receptory, například s P2X7. Ve studii zkoumající tyto heteromerní struktury ovšem nebyly objeveny žádné specifické vlastnosti těchto heteromerů, protože se autoři domnívají, že protomer tohoto heteromerního P2X4/P2X7 lišící se od zbylých dvou do jisté míry přejímá vlastnosti ostatních dvou protomerů a receptor jako celek funguje jako homomerní (Schneider et al., 2017).

3. 1. 1. Konstrukty P2X4 použité pro krystalizaci

Prvním krystalizovaným P2X receptorem je P2X4 receptor. Krystalizovaný P2X4 receptor (zfP2X4) pochází z ryby *Danio rerio* (zebríčka; zebrafish). Byl krystalizován v uzavřeném klidovém stavu bez vázaného ATP (Kawate et al., 2009) a později také ve stavu otevřeném s vázaným ATP (Hattori & Gouaux, 2012). Konstrukt, který byl krystalizován se ovšem od wild typu P2X4 receptoru v některých ohledech liší. První krystalizovaná verze P2X4 receptoru má deletovaný

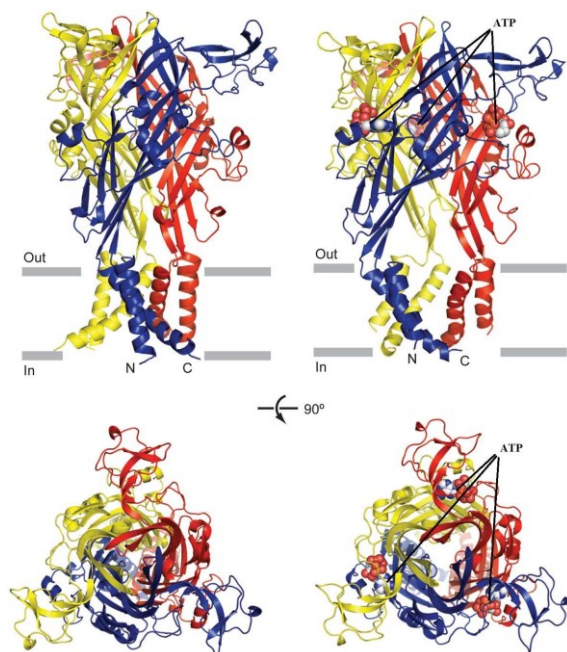
intracelulární C-konec a N-konec (Δ zfP2X4), posléze byla vytvořena ještě jedna verze P2X4 receptoru určená ke krystalizaci, v která také neobsahuje ani C-konec ani N-konec, a některé aminokyseliny v jejím řetězci byly nahrazeny jinými. Konkrétně jde o mutace Cys51Phe, Asn78Lys a Asn187Arg. Struktura této druhé verze byla řešena za pomoci známé struktury verze první, která byla analyzována pomocí sjednovlnové anomální difrakce. Struktura druhé verze má vyšší rozlišení než verze první a to 3,1 Å. Obě krystalizované verze P2X4 receptoru mají z části odlišné fyziologické vlastnosti než wild typ receptor. Rozdílnost těchto vlastností spočívá hlavně v nízké amplitudě ATP-stimulovaného proudu ve fyziologických měřeních. Maximální proud snímaný z celých buněk technikou patch clamp bývá u wild typu receptoru v řádech jednotek nA, zatímco u prvního konstruktu se pohybuje pouze ve stovkách pA a u druhého konstruktu dokonce jen v desítkách pA (Kawate et al., 2009).

Druhá studie následně vytvořila konstrukt P2X4 receptoru začínající Ser28 a končící Lys365 (Hattori & Gouaux, 2012). Tento konstrukt byl posléze krystalizován a zobrazen v rozlišení 2,9 Å. Tato studie rozdělila extracelulární doménu na lower body doménu a upper body doménu. Zároveň byl v této práci konstrukt P2X4 receptoru krystalizován v přítomnosti i nepřítomnosti ATP, což umožnilo přesné určení vazebného místa pro ATP na P2X4 receptoru, které je nejspíše velmi podobné napříč všemi typy P2X receptorů. Zároveň tato studie odhalila důvody specifické vazby a účinku právě ATP a nikoliv jiných nukleotidů, jako jsou třeba CTP, GTP nebo UTP, a také důvod absence účinku ADP nebo AMP (Hattori & Gouaux, 2012).

3. 1. 2. Celková struktura trimerního

Homomerní trimerní zfP2X4 receptor má tvar připomínající kalich, přičemž jeho extracelulární část dosahuje vzdálenosti až 70 Å od buněčné membrány a tři podjednotky P2X4 receptoru jsou symetricky složeny podle středové osy receptoru (Obr. 1 a 2). Transmembránová doména (TM) má délku 28 Å, je tvořena celkem šesti helixy, dvěma z každé podjednotky, a připomíná přeýpací hodiny. Tyto helixy leží v úhlu 45° vůči myšlené rovině membrány a jsou vůči sobě orientovány antiparalelně. Vnitřní helixy transmembránové domény (TM2) se zhruba v polovině své délky kříží, čímž utváří konstrikční místo uzavírající pór. Transmembránové domény jednotlivých podjednotek trimerního se lehce levotočivě obtáčejí kolem osy receptoru. Extracelulární části všech podjednotek receptoru se naopak obtáčejí lehce pravotočivě kolem osy receptoru a kolem sousedních podjednotek, čímž mezi sebou vytváří velké množství interakcí. Při pohledu shora, kolmo k ose receptoru, je vidět centrální pór, který se otevře po aktivaci navázáním ATP. Celkově se v receptoru nachází čtyři dutiny nazývané vestibuly, které leží nad sebou na centrální ose symetrie receptoru (obr. 3). Pod místy, kde transmembránové helixy uzavírají pór se v nachází

cytoplasmatický vestibul, který je dobře přístupný cytoplasmatickému solventu. Nad místem uzavření kanálu se nachází extracelulární vestibul, který je z části „zapuštěn membrány“ a to konkrétně k aminokyselinám Leu340 a Asn341, nad ním se nachází centrální vestibul, nad nímž je ještě poslední horní vestibul. Extracelulární vestibul je ze stran obklopen třemi fenestracemi, které jej spojují s extracelulárním solventem (Kawate et al., 2009) (Hattori & Gouaux, 2012).

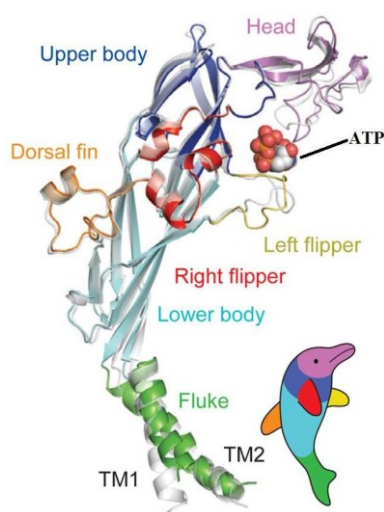


Obr. 1: Krystalová struktura zfp2X4 receptoru. Nalevo v uzavřeném stavu, napravo ve stavu otevřeném s navázaným ATP. Výchle v pohledu z boku, níže v pohledu ze shora. Přejato z a upraveno z (Hattori & Gouaux, 2012).

3. 1. 3. Struktura podjednotky

Celkový vzhled samotných podjednotek připomíná tvarově delfína, na jehož zběžné morfologii jsou jednotlivé části podjednotky rozděleny s popsány (Obr. 2). Vnitřní struktura extracelulární části podjednotky receptoru je tvořena β -sandwichovým motivem (připomínajícím transtheretin (Blake, Geisow, Oatley, Rérat, & Rérat, 1978)). Tato část podjednotky je kvůli mnohým interakcím mezi dvěma β -listy motivu velmi rigidní a pravděpodobně zůstává relativně nezměněná i při výrazných konformačních změnách receptoru. Většina kontaktů na extracelulární části mezi jednotlivými podjednotkami v receptoru je tvořena mezi horními částmi hlavních β -listů, zatímco mezi jejich spodními částmi žádné kontakty nejsou, což dává volnost transmembránovým helixům spojeným s Lower body doménou k případnému pohybu vedoucímu k otevření kanálu po vazbě ligandu. K body doméně přiléhá několik dalších domén a strukturně různých prvků, těmi jsou: head doména, dorsal fin a left a right flipper (hlava, zadní ploutev, levá ploutev a pravá ploutev; pro jednoduchost a srovnání s literaturou budou používána anglická označení). Head

doména je tvořena třemi vzájemně antiparalelními β -vláknky a jedním α -helixem, které jsou uspořádány podobným způsobem jako oligosacharid vazebný protein (Williams, Lee, Cai, Bewley, & Clore, 2005). Všechny deset konzervovaných cysteinů v extracelulární části podjednotky se mezi sebou páruje, jak se dříve předpokládalo na základě mutagenese a elektrofyziologických studií (S. J. Ennion & Evans, 2002) (Clyne, Wang, & Hume, 2002). Interakce mezi jednotlivými podjednotkami krystalu P2X4 receptoru jsou převážně tvořeny mezi extracelulárními doménami v místě prohlubně o velikosti zhruba $3,750 \text{ \AA}^2$ na jednotlivých podjednotkách. Hlavní styčné plochy mezi jednotlivými podjednotkami jsou body-body, head-body, left flipper-dorsal fin, přičemž aminokyseliny v β -listech body domény jsou vysoce konzervované napříč P2X receptory, tudíž podjednotkové body-body interakce budou také konzervované a nejspíš velmi podobné mezi všemi P2X receptory. Aminokyseliny v head doméně, left flipper a dorsal fin jsou ovšem daleko méně konzervované a head-body a left flipper-dorsal fin interakce by mohly obsahovat chemický kód určující selektivitu k agonistům a možnost skládání homomerních nebo heteromerních variant P2X receptorů. Pod body doménou se nachází transmembránová doména tvořená dvěma transmembránovými helixy (TM1 a TM2). V dalších strukturách je body doména dále dělená na upper a lower body doménu (Kawate et al., 2009).



Obr. 2: Krystalová struktura $\Delta zfp2X4$ jedné ze tří podjednotek P2X4 receptoru zebřičky (*Danio rerio*). Díky své podobnosti s delfínem mohou být části podjednotky popsány jako části těla delfína: plasmatickou membránou prochází ocasní ploutev (fluke), která je tvořena transmembránovými doménami TM1 a TM2, v extracelulárním prostoru se nachází zbytek těla (lower body a upper body), jehož součástí je levá ploutev (left flipper), zadní ploutev (dorsal fin), pravá ploutev (right flipper) a hlava (head). Na obrázku jsou znázorněny ATP navázaný mezi hlavou a levou ploutví (Hattori & Gouaux, 2012).

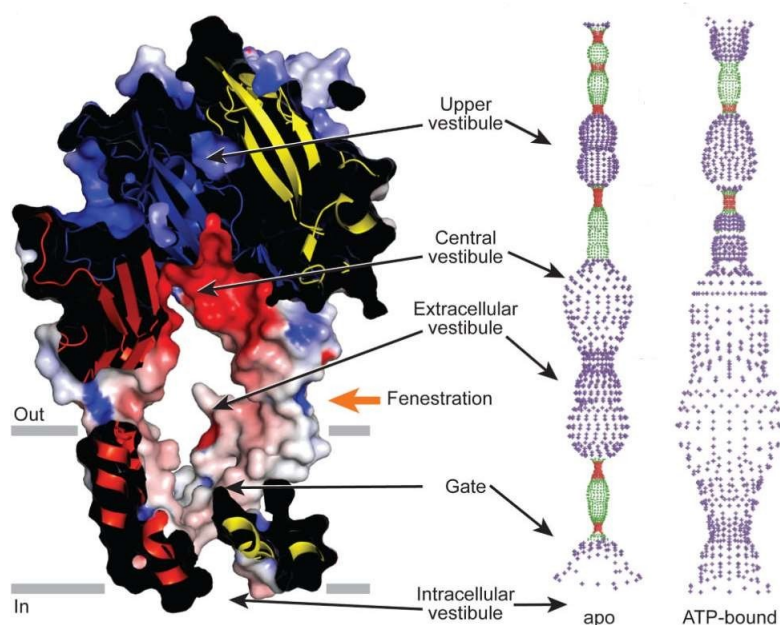
3. 1. 4. Uzavřený stav kanálu

V uzavřeném stavu jsou kolem osy receptoru v membráně uspořádány TM2 helixy, které uzavírají pór, kolem nich, jakoby na vnější straně, se nacházejí TM1 helixy.. Kanál samotný je tvořen zhruba dvěma otočkami TM2 α -helixů a je lemován hydrofobními aminokyselinami. Z extracelulární strany by se kanál dal ohraničit aminokyselinami Leu340 a Asn341, ze strany intracelulární aminokyselinami Ala347 a Leu346, přičemž ve středu pomyslného uzavřeného kanálu leží aminokyseliny Ala344, zde jsou si TM2 helixy nejbližší (Kawate et al., 2009). Autoři druhé studie zabývající se krystalovou strukturou P2X4 receptoru vytvořily několik struktur P2X4 receptoru v různých stavech. Co se intracelulárních a extracelulárních hranic týká, obě studie se shodují. V krystalu otevřeného stavu je pór lemován aminokyselinami Leu340, Ala344, Ala347, Leu351 a Ile355, přičemž v místech Ala347 a Leu351 má kanál nejúžší průměr a to 7 Å (Hattori & Gouaux, 2012).

3. 1. 5. Způsob průchodu iontů

První receptor byl krystalizován v uzavřeném – (klidovém) stavu bez vázaného ligandu, a proto zde případná cesta pro průchod iontů tedy není přímo zřetelná, ovšem autoři studie představili dle nich dvě možné cesty pro průchod kationtů (Kawate et al., 2009). Jednou z možných cest průchodu kationtů je po ose celého receptoru skrze všechny vestibuly receptoru, avšak případný otvor, jímž by ionty procházely do horního vestibulu je příliš malý, konkrétně pouze 2,3 Å, na to, aby umožňoval průchod hydratovaným kationtům. Autoři studie se v textu domnívají, že při vazbě ligandu by se otvor mohl vlivem možných konformačních změn zvětšit natolik, aby jím hydratované kationty mohli projít.

Ovšem na základě níže zmíněných krystalů (Mansoor et al., 2016) (McCarthy et al., 2019) a druhé studie zabývající se strukturou P2X4 (Hattori & Gouaux, 2012) se jako pravděpodobnější zdá autory navrhovaný druhý způsob průchodu iontů. Druhá možná cesta vede z boku, přes tři fenestrace, kteréžto obklopují extracelulární vestibul těsně nad plasmatickou membránou. Jejich průměr dosahuje velikosti až 8 Å, což je pro průchod hydratovaných kationtů dostatečné. Na intracelulární straně krystalu toho konstruktů by ionty mohly vstupovat skrze intracelulární vestibul, který svým tvarem připomíná kužel (Obr. 3), avšak konstruktů chybí většina intracelulární části, proto odpověď na otázku týkající se vstupu iontů do cytoplasmy není možné jednoznačně odpovědět s ohledem na možnou rozdílnost struktury konstruktů a wild typu zP2X4 receptoru. (Hattori & Gouaux, 2012) (Kawate et al., 2009).



Obr. 3: Zobrazení šíře prostorů v receptoru a jeho kanálu (vestibulů) po jeho ose bez ATP (apo) a s navázaným ATP (ATP-bound). Přejato a upraveno z (Hattori & Gouaux, 2012).

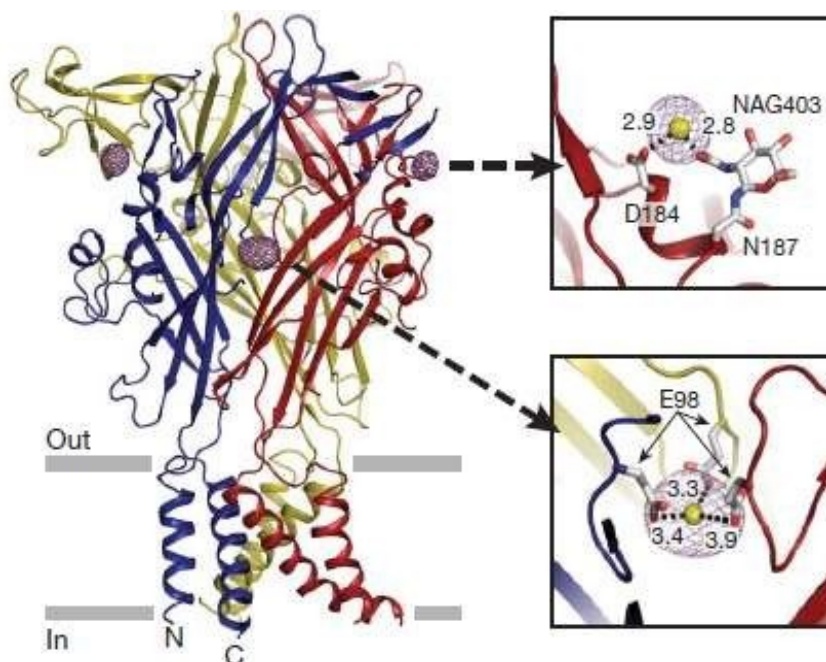
3. 1. 6. Iontová selektivita

Extracelulární vestibul zP2X4 obsahuje několik kyselých aminokyselin ležících blízko iontového kanálu, Asp 59 a Asp 61, by mohli vázat kationty a dokonce vytvářet elektrostatické pole, které by mohlo koncentrovat ionty z větší vzdálenosti. Aminokyseliny v samotném kanálu by také mohly interagovat s procházejícími ionty, konkrétně pomocí atomů kyslíku v hlavním řetězci a v řetězcích postranních, například s kyslíkem postranního řetězce Asn 341 (Kawate et al., 2009) (Gonzales, Kawate, & Gouaux, 2009).

3. 1. 7. Modulace pomocí Gd^{3+}

Při tvorbě krystalů prvního konstruktů bylo použito Gd^{3+} . V krystalu byly posléze nalezena čtyři místa, která byla hojně obsazena tímto iontem. První místo se nachází v centrálním vestibulu, kde je Gd^{3+} koordinováno karboxylovou skupinou Glu98 z každé ze tří podjednotek (Obr. 4, vpravo nahoře). Zbýlá tři místa se nachází na okrajích receptoru, konkrétně na každé podjednotce. Zde je Gd^{3+} koordinován mezi karboxylovou skupinou Asp184 a hydroxylovou skupinou N-acetylglukosaminu připojeného na Asn187 (Obr. 4, vpravo nahoře). Vzhledem k tomu, že přítomnost divalentních a trivalentních kationtů moduluje chování P2X receptorů, mohla by i vazba Gd^{3+} ovlivňovat funkci krystalizovaného kanálu. Autoři studie poté provedli elektrofyzilogická měření a zjistili, že Gd^{3+} funguje na první z konstruktů jako antagonist a že se jeho chování liší při různých

holding potenciálech. Autoři se domnívají, že je možné, že antagonismus Gd^{3+} spočívá ve vyvazování ATP a ve vazbě na kyselé aminokyseliny v centrálním vestibulu, čímž by mohl Gd^{3+} zabránit jejich možné roli v koncentrování kationtů (Kawate et al., 2009).



Obr. 4: Zobrazení dvou vazebných míst pro Gd^{3+} . Přejato a upraveno z (Kawate et al., 2009).

3. 1. 8. ATP vazebné místo

Autoři první krystalizační studie se domnívali, že ATP vazebné místo by mohlo ležet v prohlubni mezi podjednotkami, ve vzdálenosti 45 Å od transmembránové domény. V těchto prohlubních se nachází aminokyseliny známé z předchozích studií svým vlivem na otevírání receptoru v přítomnosti ATP (S. Ennion, Hagan, & Evans, 2000) (Roberts & Evans, 2004) (Jiang, Rassendren, Surprenant, & North, 2000) (Roberts & Evans, 2006) (Marquez-Klaka, Rettinger, Bhargava, Eisele, & Nicke, 2007) (Zemkova et al., 2007). Tyto aminokyseliny by svými vlastnostmi odpovídaly ATP vazebnému motivu. Toto místo, připomínající svým tvarem otevřenou mordou, obsahuje čtyři konzervované aminokyseliny - Lys70, Lys72, Phe188 a Thr189 - z jedné podjednotky a čtyři konzervované aminokyseliny – Asn296, Phe297, Arg298 a Lys316 - z podjednotky sousední a je obklopeno head doménou, body doménou, dorsal fin a right flipper. Autoři studie se domnívali, že vazba ATP by mohla způsobit zavření čelistí mordy a pohyb right flipper a dorsal fin (Kawate et al., 2009).

Následná krystalizační studie, kde byl konstrukt zfp2X4 receptoru krystalizován v přítomnosti ATP, odhalila, že ATP vazebné místo skutečně leží mezi sousedícími podjednotkami v okolí pozitivně nabitých aminokyselin, které bylo poodhaleno předchozími studiemi (Marquez-Klaka et al., 2007) (Wilkinson, Jiang, Surprenant, & North, 2006), kde je ATP rozpoznáno pomocí

množství hydrofilních interakcí. přičemž sama ATP vazebné místo obklopuje ATP vazebná kapsa, kterou tvoří upper body, lower body, head, left flipper a dorsal fin. Samotné složení řetězce P2X4 receptoru kolem ATP vazebného místa se neliší žádné jiné známé struktury. Head, left flipper a dorsal fin se přímými kontakty účastní některých interakcí s ATP (obr. 5.) (Hattori & Gouaux, 2012).

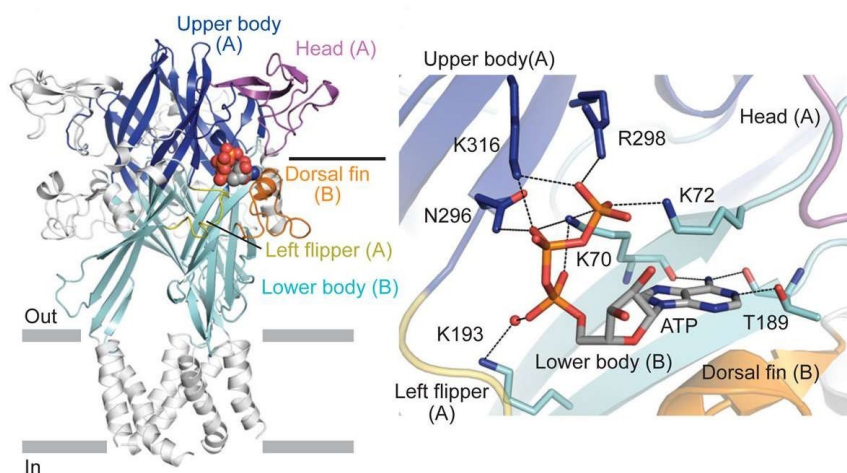
Samotné ATP se do vazebné kapsy váže v ne úplně obvyklé konformaci, neboť tvar navázaného ATP připomíná písmeno „U“. Takováto konformace ATP je také pozorována při jeho vazbě na aminoacyl syntetázu třídy II (Cavarelli et al., 1994), přičemž γ fosfátové a β fosfátové skupiny jsou nakloněny směrem k adeninovému kruhu, který je vůči ribozovému kruhu v anti konformaci a právě v této konformaci může ATP tvořit solné a vodíkové můstky s konzervovanými bazickými a polárními postranními řetězci aminokyselin v podjednotkách receptoru. Velmi zásadní je pro vazbu ATP Lys70, neboť se jeho aminová skupina nachází právě uprostřed „U“, které ATP tvoří, a interaguje atomy kyslíku všech tří fosfátových skupin ATP (Obr.5). Asn296 a Lys316 tvoří interakce s β fosfátovou skupinou, zatímco Lys72, Arg298 a Lys316 je podílejí na interakcích s γ fosfátovou skupinou ATP (Hattori & Gouaux, 2012).

Právě tyto interakce s γ fosfátovými a β fosfátovými skupinami ATP jsou nejspíše důvodem, proč ADP a AMP (Gever, Cockayne, Dillon, Burnstock, & Ford, 2006) mají na P2X receptory jen velmi malý nebo vůbec žádný efekt, neboť právě v nich tyto/tato skupina/y chybí. Glycerol v krystalu pomáhá zprostředkovat interakce mezi fosfátovými skupinami, které jsou z části vystavené solventu, a proteinem samotným, například mezi Lys193 a α fosfátovou skupinou ATP (Obr. 5). Ve fyziologických podmínkách jsou tyto interakce pravděpodobně zprostředkovány molekulami vody (Hattori & Gouaux, 2012).

Samotná adeninová báze leží hluboko v ATP vazebné kapse a je rozpoznávána pomocí tří vodíkových interakcí, kterými je interakce s postranním řetězcem Thr189 a s karbonylovými skupinami hlavního řetězce Lys70 a Thr189 (Obr. 5). Obě dvě tyto aminokyseliny jsou velmi konzervované a pravděpodobně spřažené s otevíráním iontového kanálu receptoru (Kawate et al., 2009) (S. Ennion et al., 2000) (Jiang et al., 2000) (Marquez-Klaka et al., 2007) (Roberts & Evans, 2004) (Roberts & Evans, 2006) (Bodnar et al., 2011). Dále se samotnou adeninovou bází hydrofobně interaguje Leu191 z lower body domény a Ile232 z dorsal fin. Tyto dvě aminokyseliny jsou také konzervované (Kawate et al., 2009). Ribózový kruh ATP je pomocí hydrofobních interakcí rozpoznáván pomocí Leu218 z dorsal fin a O2 a O3 atomy kyslíku jsou přístupné pro solvent, což by mohlo vysvětlovat odlišnost odpovědí P2X receptorů pro analogy ATP lišící se právě na O2 a/nebo O3 pozicích (Bianchi et al., 1999) (Caterina Virginio, Robertson, Surprenant, & North, 1998).

Jak bylo řečeno výše, struktura receptoru s vázaným ATP také umožňuje odhalit důvody, proč je ligandem P2X receptorů právě ATP, zatímco ostatní nukleotidy mají jen malý nebo vůbec žádný účinek a odpovědi P2X receptorů nejsou schopné vyvolat. Zdá se, že je možné, že CTP receptor ve velmi malé, sotva pozorovatelné míře aktivuje P2X receptory (Soto et al., 1996) (Garcia-Guzman, Soto, Gomez-Hernandez, Lund, & Stühmer, 1997). U GTP nebo UTP ovšem nebyl tento efekt na P2X receptory pozorován (Gever et al., 2006). N4 báze CTP dokáže tvořit vodíkový můstek s atomem kyslíku karbonylové skupiny aminokyseliny Lys70 a případně i s Thr189. Zároveň je CTP však příliš malé, v důsledku čehož je N3 báze v příliš velké vzdálenosti, aby dokázal zformovat vodíkový můstek s postranním řetězcem Thr189. CTP také kvůli své malé velikosti nevyplní celou ATP vazebnou kapsu a mezera, která tím tedy vzniká, také zabraňuje řádné aktivaci P2X receptorů CTP (Hattori & Gouaux, 2012).

GTP a UTP nemají na místech, kterými se ATP běžně váže, vhodné skupiny pro tvorbu interakcí s aminokyselinami nutnými k vazbě a k efektu na kanál, jakými jsou kupříkladu Lys70 a Thr189, protože nemají na P2X receptor žádný pozorovatelný vliv (Hattori & Gouaux, 2012).



Obr. 5: Zobrazení vazebného místa ATP v krystalu zP2X4 receptoru. Vlevo v kontextu receptoru, vpravo v detailu. Přejato a upraveno z (Hattori & Gouaux, 2012).

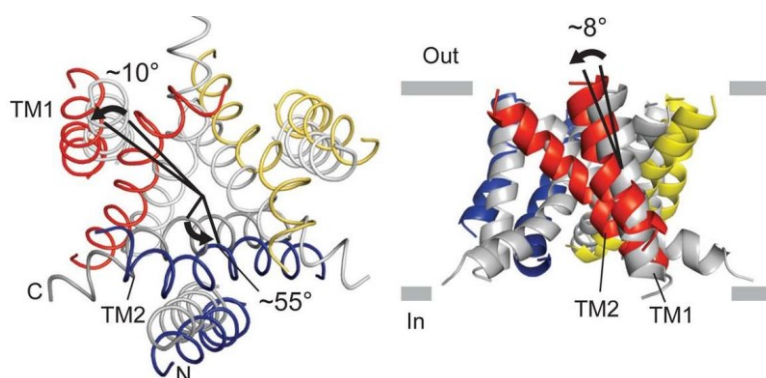
3. 1. 9. Otevřený stav kanálu

Při vazbě ATP se uzavírá prohlubeň mezi head doménou a dorsal fin, která se pohybuje nahoru k head doméně, a vytlačí left flipper z ATP vazebné kapsy. Dorsal fin a left flipper jsou strukturně spojeny s lower body doménou a jejich pohyb způsobí jakési napínání této domény, které se projeví otevřením kanálu a zvětšením extracelulárního vestibulu o 10 Å. Samotné podjednotky se pootočí o 8° kolem osy receptoru (Hattori & Gouaux, 2012).

Jak bylo řečeno výše, iontový kanál P2X4 receptoru má ve svém uzavřeném stavu nejužší místo v oblasti aminokyselin Ala347 a Leu340 (Kawate et al., 2009). Druhá zde zmíněná studie

odhalila, že ve stavu otevřeném se nejužší místo iontového kanálu nachází na místech mezi Ala347 a Leu351, přičemž průměr tohoto nejužšího místa je 7 Å. Velikost NMDG, což je velký organický kationt, o němž je známo, že P2X receptory dokáže procházet, (Khakh, Bao, Labarca, & Lester, 1999) (C. Virginio, MacKenzie, Rassendren, North, & Surprenant, 1999). je 7,3 Å, což se blíží velikosti průměru kanálu tohoto konstruktů (Hattori & Gouaux, 2012). Otevřený pór samotný není lemován hydrofilními postranními řetězci aminokyselin, které by interagovali s molekulami vody koordinovanými procházejícími ionty při jejich průchodu kanálem, proto tyto molekuly vody interagují s kyslíky karbonylových skupin aminokyselin hlavního řetězce. Při porovnání TM domén otevřeného a zavřeného kanálu konstruktů P2X4 receptoru můžeme pozorovat, že přeuspořádání jejich helixů při přechodu z jednoho stavu do druhého se děje pohybem podobným clony. (Hattori & Gouaux, 2012) (Migita, Haines, Voigt, & Egan, 2001) (Browne et al., 2011).

Při přechodu ze stavu uzavřeného do stavu otevřeného se TM1 helixy pootočí o 10° a TM2 helixy o 55° proti směru hodinových ručiček vůči ose póru, přičemž se změní sklon TM1 helixů o 8° a TM2 helixů o 2° vůči rovině membrány. Tento pohyb vede k posunutí helixů od osy kanálu do vzdálenosti o 3 Å větší, než jaká je ve stavu uzavřeném (Obr. 6). Přechod mezi těmito stavy ovlivňuje interakce TM helixů jak v podjednotce samotné, tak interakce mezi TM helixy s ostatními podjednotkami. Při vazbě ligandu jsou Leu340, Leu346 a Ala347 pootočeny od středu póru, což jim brání v tvorbě interakcí, jež mezi sebou mají v uzavřeném stavu póru. TM2 helixy se také při pohybu od osy receptoru ohýbají, čímž umožňují tvorbu interakcí mezi Leu346 a Ile351 dvou podjednotek, a stabilizují otevřenou konformaci kanálu (Hattori & Gouaux, 2012). Gly350 se zdá být důležitou aminokyselinou pro otevírání kanálu P2X4 receptoru, neboť je možné, že při změnách konformace slouží jako pant (Fujiwara, Keceli, Nakajo, & Kubo, 2009) (Khakh et al., 1999) (Hattori & Gouaux, 2012).



Obr. 6: Zobrazení změn v konformaci transmembránové domény při přechodu z uzavřeného (šedě) do otevřeného (barevně) stavu. Nalevo je pohled z intracelulárního prostoru, napravo z boku. Přejato a upraveno z (Hattori & Gouaux, 2012).

3. 1. 10. Účinek antagonistů

Na základě předchozích studií zkoumajících vliv některých aminokyselin na účinek antagonistů, se autoři studie domnívají, že PPADS nebo suramin by mohly ovlivňovat P2X₄ receptor na místech v okolí ATP vazebné kapsy a blokovat tak indukci konformačních změn vedoucích k uzavření mordy a následného otevření iontového kanálu (Kawate et al., 2009). TNP-ATP, 2',3'-O-(2,4,6-trinitrofenyl)-adenosin-5'-trifosfát, blokuje P2X receptory tím, že jeho TNP skupina zabraňuje pohybu dorsal fin směrem k head doméně (Hattori & Gouaux, 2012).

3. 2. P2X₃

P2X₃ je rychle desenzitizující P2X receptor s hodnotou EC₅₀ nacházející se v kolem 1 μ M ATP. Mezi jeho plné agonisty patří, na rozdíl od P2X₄ receptoru, například α,β -meATP a, stejně jako P2X₄ receptor, je i P2X₃ potencován zinkem (Schmid & Evans, 2019)(Wildman, King, & Burnstock, 1999b). Jeho antagonisty jsou kupříkladu PPADS, suramin, TNP-ATP nebo nízké pH (North, 2002). Při koncentraci ATP v rozmezí 30 až 300 nM se receptor otevírá na několik sekund, ovšem při vyšších koncentracích dochází k rychlé desenzitizaci během milisekund, přičemž k resenzitizaci dochází až po 15 minutách. Je také známo, že P2X₃ receptor dokáže tvořit heteromerní receptory spolu s P2X₂ receptorem (North, 2002). P2X₃ receptor se v těle nachází, podobně jako ostatní P2X receptory, v rozličných tkání, přičemž nejčastěji v neuronech sloužících k rozpoznávání bolesti. Dále je známo, že se například podílí na stahu močového měchýře nebo na vnímání teploty (Krishtal, Marchenko, & Pidoplichko, 1983) (Grubb, 1999) (Lewis et al., 1995) (Caterina Virginio, North, & Surprenant, 1998) (Souslova et al., 2000) (Vulchanova et al., 1996) (Vulchanova et al., 1997) (Chen et al., 1995) (Khakh, 2001) (Khmyz, Maximyuk, Teslenko, Verkhatsky, & Krishtal, 2008) (Abbracchio et al., 2009).

3. 2. 1. Konstrukty P2X₃ použité pro krystalizaci

Dalším z krystalizovaných receptorů byl lidský P2X₃ receptor (hP2X₃). Krystalizovaný konstrukt začíná na Asp6 a končí na Thr364 wildtype varianty receptoru (celý P2X₃ receptor má celkem 397 aminokyselin). Tento konstrukt má podobné fyziologické vlastnosti, co se vodivosti, citlivosti na ATP a rychlé desenzitizace týká, jako wild typ varianta receptoru. Poté byl ještě krystalizován druhý konstrukt, na jehož cytoplasmatické části bylo několik aminokyselin zaměněno za aminokyseliny z P2X₂ receptoru, který nedesenzitizuje. Konkrétně jde o tyto tři aminokyseliny Thr13Pro, Ser15Val a Val16Ile (Smith, Humphrey, & Murrell-Lagnado, 1999). Tato záměna zásadně mění rychlost desenzitizace P2X₃ receptoru (North, 2002) (Giniatullin & Nistri, 2013).

Druhý konstrukt se od prvního a od wild typu P2X3 receptoru tedy liší pomalou a neúplnou desenzitizací. Celkem byly vytvořeny krystaly receptoru ve třech stavech – stav otevřený s vázaným ligandem (Obr. 7 a 8), apo/zavřený klidový stav (Obr. 9) a zavřený desenzitizovaný stav (Obr. 10). K tvorbě stavu otevřeného s vázaným ligandem byl použit druhý konstrukt. Stejný konstrukt byl také použit při přípravě apo/zavřeného stavu, k němuž byli při krystalizaci přidáni ještě dva kompetitivní antagonisté – TNP-ATP a A – 317491 (Burgard et al., 2000) (Jarvis et al., 2002). K tvorbě zavřeného desenzitizovaného stavu byl použit konstrukt první. Vytvoření všech tří konstruktů odhaluje jejich vzájemným porovnáním detailnější principy mechanismu fungování hP2X3 receptoru i P2X receptorů obecně (Mansoor et al., 2016).

3. 2. 2. Všeobecná struktura

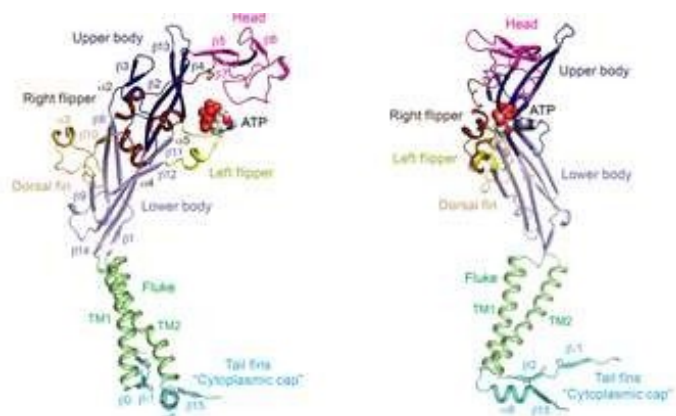
Krystalové struktury konstruktů se tvarově v zásadě neliší od krystalové struktury zfP2X4 receptoru, která je zmíněná výše. P2X3 receptor je také trimerním iontovým kanálem s kalichovité tvarovanou extracelulární částí a transmembránovou doménou, jehož jednotlivé monomery připomínají tvarem delfína. Na rozdíl od krystalu P2X4 receptoru, jsou u těchto konstruktů ve většinové míře zachovány a krystalizovány i intracelulární N a C konce receptoru, které byly u dříve krystalizovaného P2X4 receptoru odebrány. ATP vazebná kapsa se také nachází mezi dvěma podjednotkami a v zásadě se podobá té u struktury P2X4 receptoru. Dále obsahují krystalové struktury těchto konstruktů několik unikátních strukturních prvků, charakteristických pro hP2X3 receptor nebo i pro jiné P2X receptory (Kawate et al., 2009) (Hattori & Gouaux, 2012) (Mansoor et al., 2016).

3. 2. 3. Nově objevené nebo unikátní strukturní a funkční prvky

Prvním z unikátních strukturních prvků těchto krystalů těchto konstruktů je Mg^{2+} kationt vázaný v head apo/zavřeného receptoru poměrně blízko k ATP vazebné kapse. Je známo, že divaletní kationty mají vliv na vlastnosti P2X receptorů (Giniatullin & Nistri, 2013), konkrétně modulací jejich resenzitizace, avšak nezdá se, že by přítomnost Mg^{2+} jakkoli ovlivňovala schopnost vazby ATP na hP2X3 receptor (Mansoor et al., 2016).

Dalším prvkem hodným pozornosti je cytoplasmatická čepička, nacházející se na intracelulární části receptoru, která byla právě v této studii popsána poprvé. Cytoplasmatická čepička je struktura, která je tvořená sítí tří β -listů a takřikajíc sedí na cytoplasmatickém povrchu. Tyto β -listy se sestávají z koncových β -vláken obou konců podjednotek, přičemž C-koncové β -vlákno jedné podjednotky interaguje s N-koncovým β -vlákem obou sousedících podjednotek receptoru, tedy každý ze tří β -listů, z nichž se cytoplasmatická čepička sestává, je tvořen jedním β -

vlákem z každé z podjenotek (Obr. 7). Cytoplasmatická čepička je však pozorovatelná pouze v otevřeném stavu a to pouze u krystalových struktur druhého, pomalu desenzitizujícího, konstruktu, který, jak bylo řečeno výše, obsahuje ve svém C-konci tyto, také výše zmíněné, tři mutace Thr13Pro, Ser15Val a Val16Ile. Zdá se tedy, že právě tyto tři aminokyseliny pocházející z nedesenzitizujícího P2X2 jsou příčinou tvorby cytoplasmatické čepičky v otevřeném stavu tohoto konstruktu P2X3 receptoru. To, že je čepička viditelná pouze v otevřeném stavu vede k myšlence, že jde pravděpodobně o dynamickou strukturu, která se skládá až při vazbě ligandu a otevírání kanálu, přičemž prvky, které ji tvoří jsou, pokud je kanál receptoru zavřený, v nestrukturovaném stavu, pokud je kanál receptoru zavřený. (Mansoor et al., 2016).



Obr. 7: Protomer hP2X3 receptoru ze dvou úhlů s rozdílem 90°. Model ukazuje rozložení α -helixů a β -listů v extracelulární a cytoplasmatické doméně. Přejato a upraveno z (Mansoor et al., 2016).

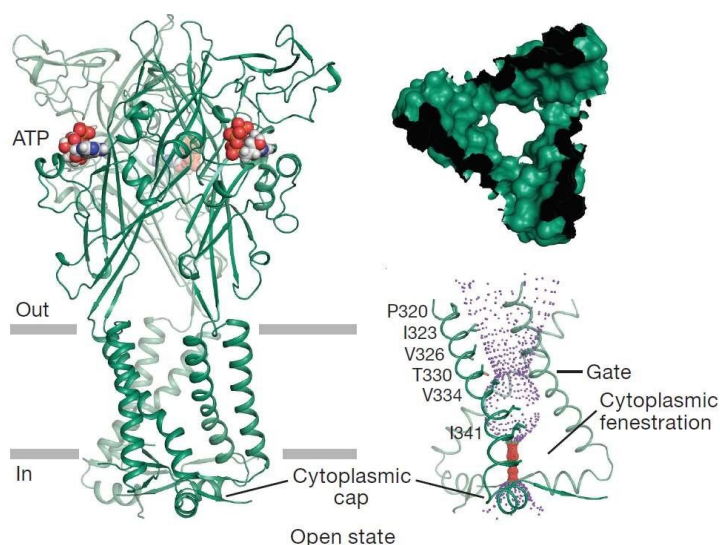
3. 2. 4. Stavby hP2X3 receptoru a přechody mezi nimi

Díky vytvoření struktur konstruktů hP2X3 ve více stavech je možné pozorovat změny, které se dějí při přechodech hP2X3 receptoru, případně P2X receptorů všeobecně, mezi jejich jednotlivými stavy. Při vazbě ligandu, stejně jakou výše popsaného P2X4 receptoru, dochází k uzavření prohlubně mezi head doménou a dorsal fin a pohybu left flipper směrem od středové osy receptoru. Tento pohyb je následně přenesen do nerigidní lower body domény, která se pohybem β -vláken $\beta 1$, $\beta 9$, $\beta 11$ a $\beta 14$ směrem od středové osy receptoru napne (Obr. 7 a 8). β -vlákna $\beta 1$ a $\beta 14$ jsou přímo spojeny s helixy transmembránových domén a jejich pohyb a napnutí povytahuje helixy z membrány, čímž dochází clonu připomínajícím pohybem k otevření póru kanálu P2X3 receptoru. Samotný pór je v uzavřeném stavu lemován postranními řetězci aminokyselin TM2 helixu, jimiž jsou Ile323, Val326, Thr330 a Val334, přičemž Ile323 je v tomto stavu extracelulární hranicí kanálu a na tomto místě je velikost uzavřeného póru 0,3 Å, a Thr330 je hranicí intracelulární, jejíž velikost dosahuje 0,7 Å. Při povytahování helixů z membrány se TM2 pootáčí o 15° proti směru hodinových ručiček a Ile323 je povytažen o 6 Å a odtočen od středu póru. Thr330 je také povytažen, o 5,3 Å, a také odtočen od středu póru. V hP2X3 dochází natahováním helixů k jejich částečné změně z α -

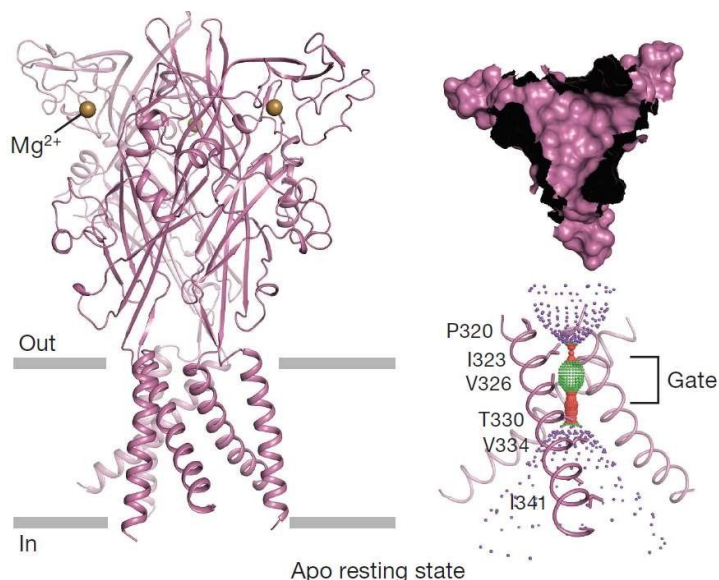
helixu na 3_{10} -helix s centrem v aminokyselinách Gly333, Val 334 a Gly335, přičemž tato změna hloubky helikální žlabu je tedy spojena s otevíráním kanálu a, jak bude vysvětleno níže, i s jeho desenzitizací. Dochází zde tedy i ke změnám sekundární struktury u krystalových struktur konstruktů P2X4 nepozorovaných, dost možná z důvodu absence jejich intracelulárních částí. Zdá se, že cytoplasmatická čepička slouží ke kotvení cytoplasmatické části helixů (Obr. 8), čímž drží pór otevřený a zároveň zabraňuje desenzitizaci, udržováním helixů v jejich napnutém stavu zajišťujícím konformaci 3_{10} -helixu (Hattori & Gouaux, 2012) (Mansoor et al., 2016).

V otevřeném stavu obsahuje receptor nepřerušovaný pór s nejužším místem dosahujícím průměru 3,2 Å, což je dostatečná velikost pro umožnění průchodu částečně hydratovaného Na^+ , přičemž Thr330, který se nacházel na intracelulární hranici póru, nyní leží právě v nejužším místě póru. Thr330 a Ser331 jsou nyní jedinými hydrofilními aminokyselinami v póru (Mansoor et al., 2016) (Degreve, Vechi, & Junior, 1996).

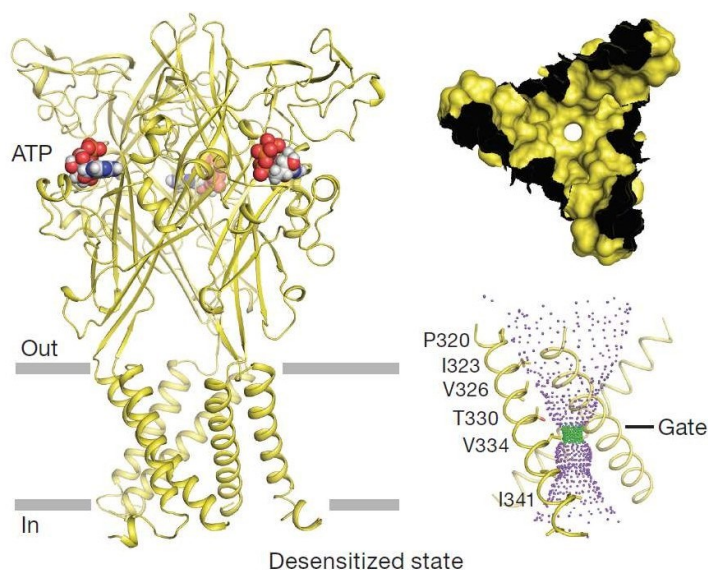
Při přechodu do stavu desenzitizovaného se cytoplasmatické části helixů pootočí o 9° a uvolní tím napětí na transmembránovém helixu, který se v tu chvíli mění zpět na α -helix. Val334 se otáčí posouvá o 4,4 Å směrem ven z buňky do středu póru a vytváří se tak na jeho místě nové konstrikční místo, jehož průměr dosahuje 1,5 Å. K uvolnění cytoplasmatické části helixů dochází rozpadem čapky. Při jejím rozpadu se N-konec otáčí a míří směrem od centra póru, což je opak toho, jak je orientován v otevřeném stavu. P2X receptory obsahují na svém N-konci konzervovaný glycin, Gly24 (P2X3 číslování), a mnohé mají glycin i na svém C-konci. Tento glycin by mohl sloužit jakožto pant při otevírání a zavírání kanálu P2X receptoru (Hausmann et al., 2014) (Fujiwara et al., 2009) (Khakh et al., 1999) (Mansoor et al., 2016).



Obr. 8: Otevřený stav hP2X3 kanálu s cytoplasmatickou čepičkou. Vlevo pohled z boku, vpravo nahoře pohled na TM doménu a cestu pro ionty, vpravo dole zobrazení šíře TM domény. Přejato a upraveno z (Mansoor et al., 2016).



Obr. 9: Zavřený klidový stav hP2X3 kanálu. Vlevo pohled z boku, vpravo nahoře pohled na TM doménu a cestu pro ionty, vpravo dole zobrazení šíře TM domény. Přejato a upraveno z (Mansoor et al., 2016).

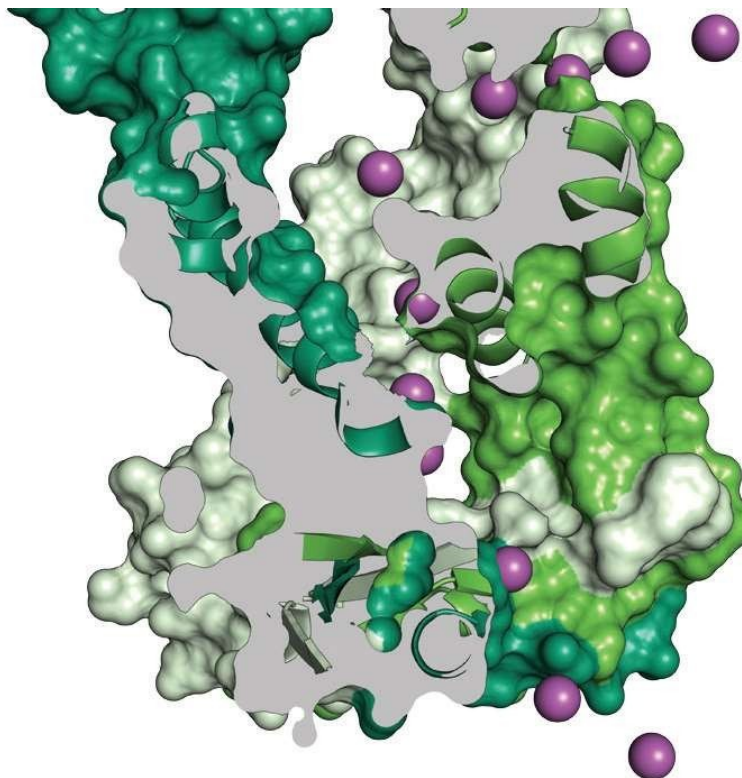


Obr. 10: Desenzitizovaný stav hP2X3 kanálu. Vlevo pohled z boku, vpravo nahoře pohled na TM doménu a cestu pro ionty, vpravo dole zobrazení zúžení TM domény. Přejato a upraveno z (Mansoor et al., 2016).

3. 2. 5. Způsob průchodu iontů

Ionty prochází kanálem velmi podobně jako u P2X4 tedy postranními fenestracemi těsně nad membránou v extracelulární části receptoru. Autoři studie také krystalizovali receptor v přítomnosti CsCl, aby odhalili místa vazby monovalentních kationtů. Jedno takové místo se nachází v extracelulárním vestibulu, což potvrzuje variantu průchodu fenestracemi. Na intracelulární části

receptoru vytváří cytoplasmatická čepička spolu s TM2 helixy sousedících podjednotek celkem tři cytoplasmatické fenestrace (Obr. 8), z části zapuštěné do membrány, jimiž by mohly ionty kanál opouštět a které jsou obklopeny polárními hlavičkami molekul lipidů. V počítačových modelech mohou těmiho fenestracemi ionty procházet (Obr. 11) (Mansoor et al., 2016).

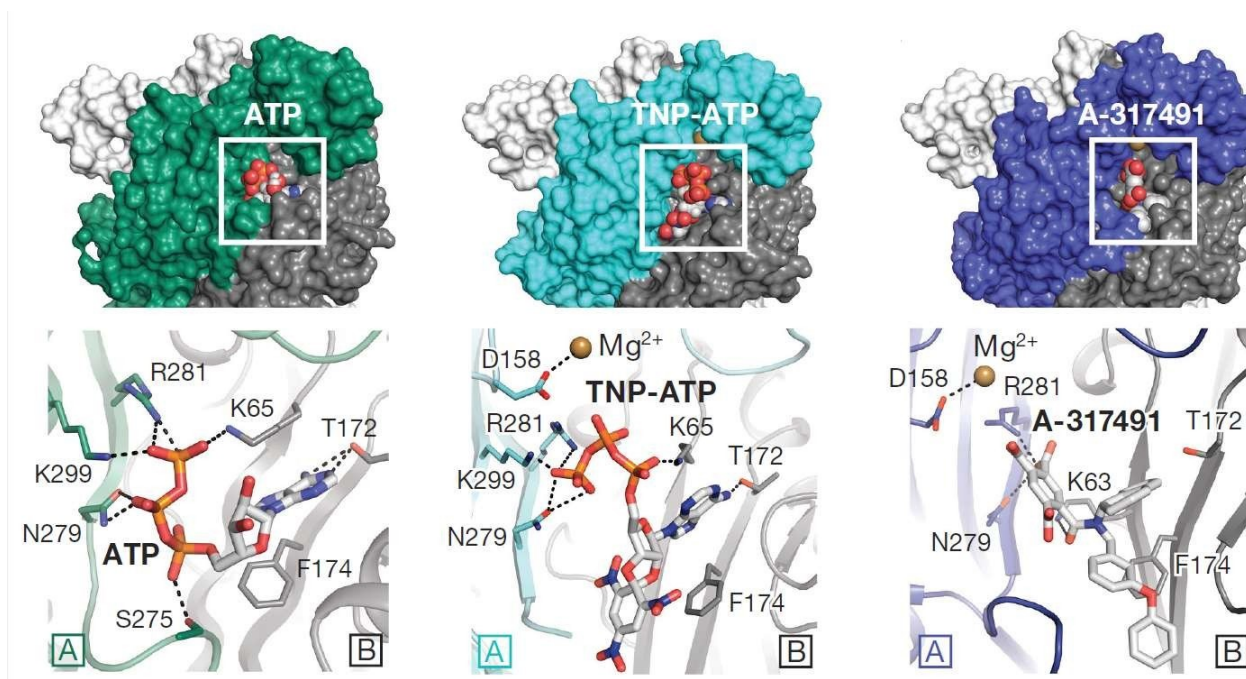


Obr. 11: Zobrazení průchodu iontů skrz kanál hP2X3 v počítačových simulacích. Ionty se pohybují (od shora dolů) skrz extracelulární fenestrace, následně přes kanál a nakonec přes cytoplasmatické fenestrace. Přejato a upraveno z (Mansoor et al., 2016).

3. 2. 6. Vazba a efekt antagonistů

Jak bylo řečeno výše, hP2X3 konstrukty byly krystalizovány i v přítomnosti antagonistů TNP-ATP a A-317491. Stejně jako ATP, se i tito antagonisté váží do ATP vazebné kapsy nacházející se mezi dvěma podjednotkami receptoru (Mansoor et al., 2016) (Jarvis et al., 2002) (Burgard et al., 2000). Rozdíl mezi vazbou ATP a vazbou antagonistů spočívá v tom, že antagonisté se do prohlubně ATP vazebné kapsy váží hlouběji a poněkud odlišným způsobem. A-317491 se, oproti do „U“ vázajícímu se ATP, váže spíše ve tvaru připomínajícím „Y“, kde fenoxi-benzylová část molekuly tvoří „kmen“ písmena „Y“ (Mansoor et al., 2016) (Hattori & Gouaux, 2012). TNP-ATP se váže pomocí svých C2 a C3 atomů uhlíku a jeho γ fosfátová skupina směřuje hlouběji do prohlubně, zatímco u ATP míří tato skupina na opačnou stranu, kde interaguje s Lys 65 (hP2X3

číslování). „Kmen“ TNP-APT a A-317491 svou přítomností s hlubším prostorem vazebné kapsy, kde hydrofobně interagují s Phe174, což ATP nemůže (Obr. 12), efektivně zabraňují pohybu dorsal fin nahoru směrem v head doméně a tedy i následným pohybům nutným k otevření iontového kanálu (Mansoor et al., 2016) (Hattori & Gouaux, 2012).



Obr. 12: Zobrazení způsobu vazby ATP a výše zmíněných antagonistů na hP2X3 receptor písmena A a B ve spodní části odlišují podjednotky receptoru. Přejato a upraveno z (Mansoor et al., 2016).

3. 3. P2X7

P2X7 receptor je funkčně nejbohatším z P2X receptorů a to právě díky množství jeho strukturních prvků, které jsou níže zmíněny. Tento receptor má k ATP nejnižší afinitu ze všech P2X receptorů, přičemž jeho EC_{50} leží v hodnotách 300 μ M koncentrace ATP. Pozoruhodnou vlastností tohoto kanálu je i takzvaný „run up“, který spočívá v tom, že po opakované aplikaci agonisty dochází ke zvětšení amplitudy maximálního proudu. Stejně jako jemu podobný P2X4 receptor, je i P2X7 necitlivý k α,β -meATP, avšak, na rozdíl od všech ostatních typů P2X receptorů, je možné jako P2X7 specifický ligand použít BzATP, které je až třicetinasobně potentnějším agonistou než přirozeně se vyskytující ATP (Surprenant, Rassendren, Kawashima, North, & Buell, 1996) (North, 2002) (Schmid & Evans, 2019).

P2X7 je poměrně necitlivý k suraminu a PPADS, ovšem na něj inhibičně působí dvojmocné kationty, zinek a nízké pH (North, 2002) (Surprenant et al., 1996) (Ase, Therrien, & Séguéla, 2019). P2X7 receptor hraje nemalou roli v mnoha fyziologických funkcích, včetně účasti na signalizaci bolesti, tvorbě inflammasomů a buněčné smrti (Linden, Koch-Nolte, & Dahl, 2019) (Kopp et al., 2019).

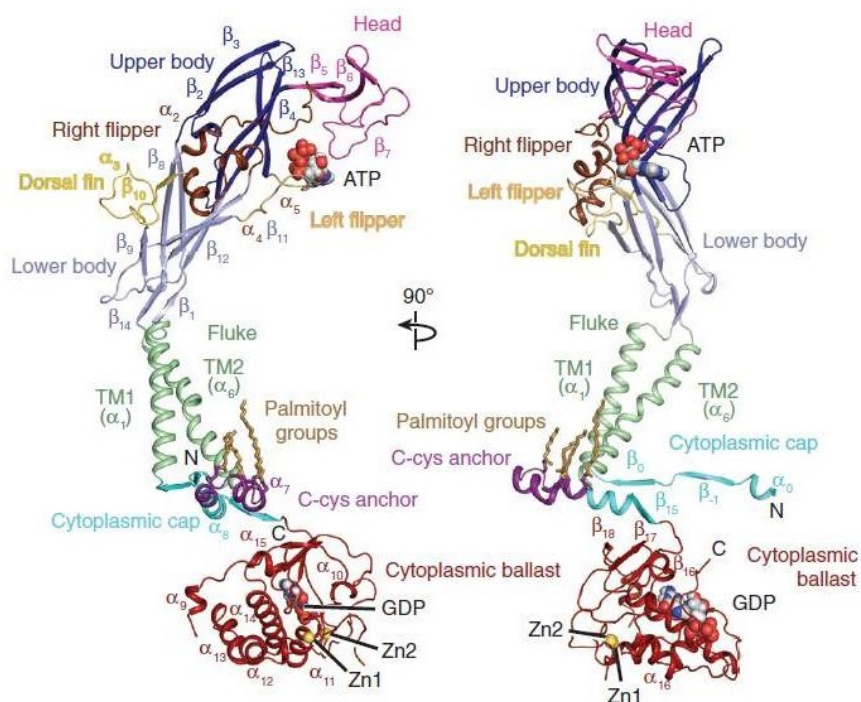
Jednou z fyziologicky zajímavých vlastností P2X7 receptoru je indukce takzvaného „membránového blebbing“, který vede k tvorbě bublinám podobných útvarů na membráně. Dále je známo, že aktivace P2X7 receptoru vede k přenosu fosfatidylserinu na vnější list plasmatické membrány (North, 2002) (C. Virginio, Mackenzie, North, & Surprenant, 1999) (MacKenzie et al., 2001) (Elliott et al., 2005). P2X7 je možné najít v mnoha rozličných typech buněk, například v makrofázích, T-buňkách, oligodendrocytech, schwannových buňkách nebo v astrocytech. Je také známo, že P2X7 receptor hraje roli k rakovinném bujení (Kopp et al., 2019) (Teresa Miras-Portugal, Sebastián-Serrano, De Diego García, & Díaz-Hernández, 2017).

3. 3. 1. Konstrukty P2X7 použité pro krystalizaci

Pro pochopení struktury a funkce P2X7 receptoru jsou zásadní hlavně dvě krystalizační studie, zabývající se hlavně konkrétními aspekty některých prvků jeho struktury, která je jinak všeobecně velmi podobná oběma dvěma výše popsaným receptorům. Jedna ze studií se zabývala převážně strukturou a funkcí cytoplasmatické části P2X7 receptoru (McCarthy et al., 2019), zatímco druhá studie řeší vliv a funkci několika antagonistů P2X7 v rámci struktury tohoto receptoru a jeho strukturních specifik. Krystal první ze studií vychází z upraveného pandího P2X7 receptoru (pdP2X7) (Karasawa & Kawate, 2016a). Zatímco druhá studie, která se zabývala jeho cytoplasmatickou částí, používala k tvorbě krystalu potkaní P2X7 receptor (rP2X7) (McCarthy et al., 2019).

3. 3. 2. Všeobecná struktura

P2X7 receptor se až na strukturní detaily neliší od dvou výše popsaných P2X receptorů, co se extracelulární a transmembránové části receptorů týče. Stejně, jako ostatní dva receptory, má tvar kalichu, je trimerní, přičemž jeho extracelulární a transmembránové části podjednotky připomínají tvarově delfína (Obr. 13), a vazebná kapsa pro ATP se nachází v oblasti konzervovaných aminokyselin mezi dvěma podjednotkami (McCarthy et al., 2019). Zásadní rozdíl mezi P2X7 a ostatními P2X receptory spočívá v jeho intracelulární části, jejíž C-konec, sestávající se ze zhruba 40% řetězce, je daleko delší než u všech ostatních typů P2X a obsahuje několik funkčních a strukturních oblastí objevujících se, jak je alespoň zatím známo, pouze u P2X7 receptoru. Dlouhý C-konec zásadně ovlivňuje jejich specifické fyziologické vlastnosti tohoto receptoru (North, 2002) (Kopp et al., 2019).



Obr. 13: Zobrazení protomeru P2X7 receptoru za dvou úhlů z rozdílem 90°. Kromě ocasní ploutve (fluke), těla (lower body a upper body), levé ploutve (left flipper), zadní ploutve (dorsal fin), pravé ploutve (right flipper) a hlavy (head), je na obrázku znázorněna cytoplasmatická čepička (cytoplasmic cap), palmitoylované skupiny (palmitoyl groups), cysteinová kotva (C-cys anchor) a cytoplasmatický balast (cytoplasmic ballast). Přejato a upraveno z (McCarthy et al., 2019).

3. 3. 3. Objevené nové strukturní a funkční prvky v cytoplasmatické části a v její blízkosti

Jak bylo řečeno výše, oblastí zodpovědnou za mnoho specifických vlastností P2X7 receptoru je C-konec jeho podjednotek (Kopp et al., 2019). Recentnější ze studií se právě těmito částmi rP2X7 receptoru zabývala a její autoři v nich objevili několik strukturních prvků důležitých pro pochopení funkce P2X7 receptoru a P2X receptorů všeobecně (Obr. 13) (McCarthy et al., 2019).

Prvním prvkem objeveným na intracelulární části rP2X7 je cytoplasmatická čepička. Tato struktura je svou funkcí a vzhledem velmi podobná té, která se nachází u struktury krystalu hP2X3 z výše zmíněné studie (Mansoor et al., 2016). Přítomnost této čepičky a několika dalších prvků, které budou níže zmíněny, vysvětluje, proč P2X7 receptor ani při delší aplikaci ATP nedesenzitizuje. V P2X7 receptoru je, ale na rozdíl od P2X3 receptoru, cytoplasmatická čepička přítomná i ve stavu uzavřeném bez ATP a je tedy pravděpodobně stálým a stabilním prvkem tohoto

receptoru. Tato čepička je tvořena β -vlákny z N-konce dvou protomerů, konkrétně $\beta 0$ a $\beta 1$, a $\beta 15$ ze třetího z protomerů (McCarthy et al., 2019).

Dalším z důležitých strukturních prvků intracelulární části P2X7 receptoru je, autory studie nazvaná, C-cys kotva (Obr. 15). Tento prvek se nachází v na cystein bohaté oblasti řetězce poblíž vnitřní strany membrány. Jedná se o 21 aminokyselin dlouhou sekvenci začínající na konci TM2, která zde tvoří smyčku směřující nejdříve směrem do osy proteinu a poté se k němu navracející a připojuje se k $\beta 15$, což tento prvek přímo spojuje s cytoplasmatickou čepičkou a s TM2. Na cysteinech C-cys kotvy jsou navázané palmitoylové skupiny směřující nahoru do membrány. Tyto palmitoylové skupiny jsou vázány přinejmenším na Cys362, Cys363, Cys374, Cys377 a, ač se nejedná o cystein, tak i na Ser360. Další palmitoylovaný cystein, který ovšem není součástí C-cys kotvy je Cys4 nacházející se na N-konci řetězce. Takováto vazba palmitoylových skupin a jejich uspořádání pravděpodobně slouží k zakotvení této části receptoru k membráně. C-cys kotva slouží k udržování čepičky ve funkčním stavu v blízkosti TM, což brání ztrátě pnutí helixů v otevřeném stavu kanálu, čímž zabraňuje jeho desenzitizaci (McCarthy et al., 2019). Při odstranění nebo záměně cysteinů za alanin receptor desenzitizuje (Allsopp & Evans, 2015) (McCarthy et al., 2019).

V cytoplasmatické doméně se nachází ještě množství dalších cysteinů, které pravděpodobně slouží pro transport (trafficking) receptoru na membránu. Tyto cysteiny, Cys477, Cys479, Cys498, Cys499, Cys506, Cys572, Cys573, ovšem palmitoylované nejsou. Jsou-li mutovány, receptor se nedostane na membránu, zůstává v endoplasmatickém retikulu a je posléze degradován (Gonnord et al., 2009). Tyto cysteiny nejsou palmitoylovány proto, že se dle krystalových struktur nacházejí hluboko ve struktuře níže popsaného prvku intracelulární části P2X7 receptoru (McCarthy et al., 2019).

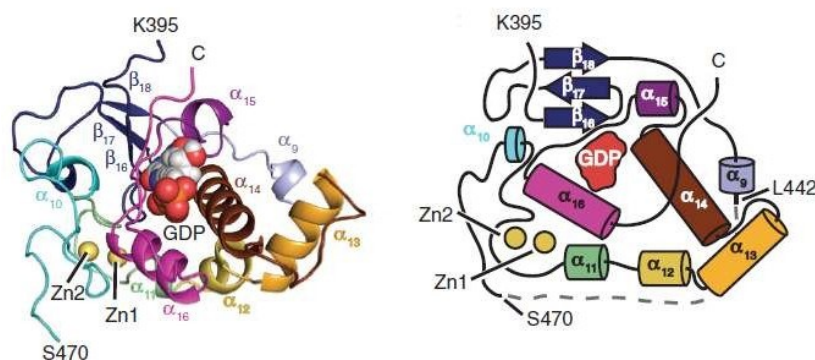
Posledním z nově objevených prvků je takzvaný cytoplasmatický balast. Jedná se o strukturu tvořenou z 200 aminokyselin, přičemž každá podjednotka má vlastní cytoplasmatický balast, který visí pod podjednotkou sousední. Celkový tvar cytoplasmatického balastu je globulární, lehce připomíná klín a sestává se ze tří β -vláken, $\beta 16$, $\beta 17$ a $\beta 18$, tvořících antiparalelní β -list a osmi α -helixů různých délek, které jsou vzájemně spojeny pomocí smyček a tvoří takzvaný helikální váček (Obr. 14). Hned za výše zmíněným β -listem se hlavní řetězec stáčí zpět k ose symetrie receptoru, kde dochází k interakcím mezi krátkými α -helixy, $\alpha 9$, z každé podjednotky. Zde ovšem není elektronová hustota struktury patrná, čímž modely otevřeného stavu kanálu postrádají přesnou polohu aminokyselin Ser443 a Arg471. Autoři proto vytvořili model, kde se každý cytoplasmatický balast sestává pouze z jednoho řetězce a nedochází k pokračování řetězce cytoplasmatického balastu řetězcem sousední podjednotky. Jednotlivé části cytoplasmatického balastu jsou mezi protomery spojeny interakcemi α -helixů $\alpha 12$ a $\alpha 13$ každého z protomerů, které tvoří hexagonální otvor, jímž posléze prochází mezi sebou vzájemně interagující výše zmíněné α -

helixy α_9 , které v otvoru tvoří takzvanou cytoplasmatickou zátku. Právě kvůli takovému uspořádání se zdá, že ionty, jež kanálem P2X7 receptoru prochází, se pohybují na cytoplasmatické části receptoru cestou nevedoucí podél osy receptoru či skrz ni (McCarthy et al., 2019).

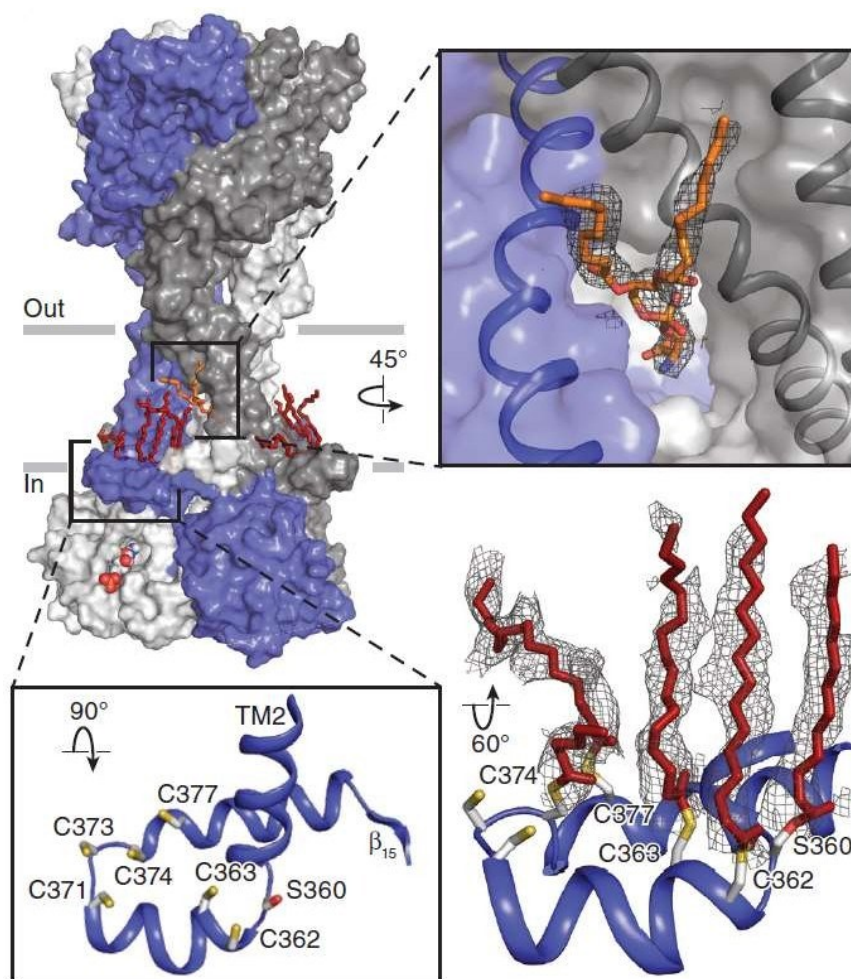
Samotný cytoplasmatický balast obsahuje dva další pozoruhodné prvky, prvním z nichž je vazebné místo pro Zn^{2+} ionty. Sedm z výše zmíněných nepalmitoylovaných cysteinů, které směřují k sobě, tvoří v cytoplasmatickém balastu tetrahedrální strukturu odpovídající svým uspořádáním vazebnému místu pro právě Zn^{2+} ionty (Kochańczyk, Drozd, & Krezel, 2015) (McCarthy et al., 2019). Z dalších měření vyplývá, že každý protomer P2X7 váže dva Zn^{2+} ionty, jejichž vazba je pravděpodobně důležitá pro transportu receptoru, neboť mutace v cysteinech vázajících tyto ionty způsobuje to, že receptor zůstává v endoplasmatickém retikulu a je následně degradován (Gonnord et al., 2009) (McCarthy et al., 2019).

Druhým prvkem objeveným v cytoplasmatickém balastu je GDP vázané v otevřeném i v uzavřeném stavu. Toto vazebné místo váže s podobnou afinitou také GTP a GTP- γ -S, zatímco ostatní nukleotidy mají řádově výrazně nižší afinitu. Vazebná kapsa pro GDP nebo GTP se nachází mezi dvěma cytoplasmatickými balasty a je dostupná solventu, každý P2X7 receptor tedy váže tři GTP nebo GDP. Pro zjištění vlivu cytoplasmatického balastu na elektrofyzilogické vlastnosti P2X7 receptoru vytvořili autoři studie konstrukt, jemuž chybí cytoplasmatický balast. Z elektrofyzilogických měření toho konstruktu vyplývá, že přinejmenším na vodivostní vlastnosti P2X7 receptoru nemá cytoplasmatický balast žádný významný vliv (McCarthy et al., 2019).

Dalším prvkem, objeveným touto studií je molekula nacházející se mezi TM helixy poblíž C-Cys kotvy. Tato molekula by mohla odpovídat fosfatidylserinu a její poloha v receptoru by mohla souviset s flipázovou aktivitou P2X7 receptoru (Obr.15) (Elliott et al., 2005) (McCarthy et al., 2019).



Obr. 14: Strukturní (nalevo) a schematické (napravo) zobrazení cytoplasmatického balastu rP2X7 receptoru. Přejato a upraveno z (McCarthy et al., 2019).



Obr. 15: Zobrazení P2X7 receptoru s cytoplasmatickou kotvou a palmitoylovanými a palmitoylovatelnými aminokyselinami a vázanou molekulou podobnou fosfatidylserinu (vpravo nahoře). Vlevo nahoře zobrazení molekuly podobné fosfatidylserinu. Dole jsou zobrazeny cytoplasmatické kotvy v detailu. Přejato a upraveno z (McCarthy et al., 2019).

3. 3. 4. Další významné prvky P2X7 receptoru

Intracelulární část P2X7 receptoru, obzvláště pak jeho dlouhý C-konec, obsahuje množství funkčně zajímavých oblastí, které se v mnoha případech podílejí na běhu různých signálních drah. Různé delece nebo mutace v C-konci P2X7 receptoru mají tedy posléze vliv na některé jeho funkční vlastnosti (Kopp et al., 2019). Bylo zjištěno, že až 95% C-konce (po aminokyselinu 581) je nutných k zachování schopnosti toho receptoru zprostředkovat příjem fluorescenčního barviva ethidia buňkou (Smart et al., 2003). Delece či některé mutace, konkrétně Cys572Gly, Arg574Gly nebo Phe581Gly, v oblasti 551 až 581 vedou k ztrátě povrchové exprese, ovšem při zkrácení řetězce proteinu, v oblasti 380 až 550, dochází k návratu schopnosti povrchové exprese a uvažuje se tedy, že oblast 551 až 581 obsahuje retenční motiv, který je v nemutovaném proteinu skryt a objevuje se právě v přítomnosti výše zmíněných mutací či delecí (James S. Wiley et al., 2003).

Výše zmíněná oblast se částečně překrývá s dalším prvkem C-konce P2X7 receptoru, kterým je lipid interakční nebo domnělý lipopolysacharid (LPS) vazebný motiv, nacházející se v oblasti 574 až 589. Tento motiv je z části podobný LPS vazebné domnělé LPS vazebného proteinu, a to s 44% podobností, a bakteriálního permeabilitu zvyšujícího proteinu (BPI protein) s podobností 31%, přičemž v in vitro podmínkách je tato oblast skutečně schopná vázat LPS protein (Denlinger et al., 2001). Pro tuto schopnost tohoto motivu jsou zřejmě důležité zásadité aminokyseliny Arg 578 a Lys 579, neboť jejich mutací v hP2X7 ztrácí receptor schopnost vázat LPS protein a zároveň se také přestává v důsledku těchto mutací objevovat na membráně (Denlinger et al., 2003). Lipid interakční motiv by také mohl sloužit k lokalizaci receptoru, například do membránových raftů (Kopp et al., 2019); tato interakce byla potvrzena kupříkladu v T – buňkách (Bannas et al., 2005).

Dalším důležitým motivem je calmodulin vazebný motiv, tvořený sekvencí ([I-x(3)-L-x(10)-W]), nacházející se v oblasti 541 až 560, který byl identifikován v rP2X7 receptoru exprimovaném v HEK294 buňkách (Roger, Pelegrin, & Surprenant, 2008). Calmodulin vazebný motiv se v lidském P2X7 receptoru ovšem nenachází, avšak může být vytvořen pomocí těchto tří mutací, Thr541Ile, Cys552Ser a Gly559Val, a to včetně následných funkcí fyziologických vlastností s ním spojených (Roger, Gillet, Baroja-Mazo, Surprenant, & Pelegrin, 2010).

Sekvence aminokyselin hP2X7 receptoru se v oblasti 438 až 533 podobá Death doméně lidského tumor necrosis faktor receptor 1 s 20% identitou a 50% mírou konzervovanosti (Denlinger et al., 2001). Tato část řetězce, konkrétně aminokyseliny 450 až 456, obsahuje dva překrývající se PxxP motivy, které by mohly sloužit jako vazebné motivy pro SH3 domény [cellular sarcoma tyrosine kinase (c-Src) homology 3 (SH3) domains] (Watters et al., 2001).

Dále jsou v C-koncové části receptoru dvě sekvence, 457 až 462 a 565 až 569, podobné dileucinovému motivu, ([D/E]xxxL[I/L]), které by mohly hrát roli v transportu (J. S. Wiley, Sluyter, Gu, Stokes, & Fuller, 2011) (Kozik, Francis, Seaman, & Robinson, 2010). Další dvě sekvence aminokyselin P2X7 C-konce by mohly sloužit k vazbě na cytoskelet. Aminokyseliny 389 až 405 jsou z 53% identické s aminokyselinami s cytahderence high molecular weight protein 3 z mycoplasmy genitalium, které slouží k vazbě aktinových vláken (Denlinger et al., 2001) (Watters et al., 2001). Druhá takováto sekvence se nachází v rP2X7 jedná se o KSLQDVK sekvenci ležící v oblasti 419 až 425, která je homologní s α -actin 2 vazebnou sekvencí v NR1 podjednotce glutamátového receptoru (Kim, Jiang, Wilson, North, & Surprenant, 2001) (Gu, Rathsam, Stokes, McGeachie, & Wiley, 2009).

Upstream a downstream od na cystein bohatých domén leží cholesterol recognition amino acid sequence motif (CRAC). Tyto CRAC motivy, sestávající se ze sekvencí [(L/V)X1–5YX1–5(K/R)], se nachází v oblastech 354 až 364 a 378 až 387. Tyto sekvence jsou v lidském a potkaním

P2X7 konzervované. Další CRAC motivy se nachází také v 10 až 17 a 45 až 54 v N-konci P2X7 receptoru (Robinson, Shridar, Smith, & Murrell-Lagnado, 2014).

3. 3. 5. způsob průchodu iontů

V krystalové struktuře uzavřeného pdP2X7 kanálu první studie je kanál samotný v tomto stavu uzavřen aminokyselinami Gly338, Ser339 a Ser342 (Karasawa & Kawate, 2016a). Druhá ze studií popisuje pór podrobněji. V uzavřeném stavu se Ser339 nachází na extracelulární hranici póru a Ser342 na hranici intracelulární a společně s Gln332 a Val335 směřují do středu póru. Největší vzdálenost v konstričním místě póru dosahuje velikosti 0,1 Å, což pro průchod iontů nestačí. V otevřeném stavu nejmenší velikost póru dosahuje hodnot 2,5 Å, což by mělo stačit na průchod částečně hydratovaného Na⁺, přičemž Ser339 je pootočen a posunut od centra póru směrem k extracelulárnímu povrchu (McCarthy et al., 2019).

3. 3. 6. ATP vazebné místo

Vazebné místo, se stejně jako u ostatních známých struktur P2X receptorů (Hattori & Gouaux, 2012) (Mansoor et al., 2016), nachází mezi podjednotkami, kde se ATP váže do ATP vazebné kapsy a to konformaci připomínající tvarem písmeno „U“. Aminokyseliny zprostředkující vazbu ATP a jeho následný efekt, jsou také vysoce konzervované a u P2X7 receptoru se jedná o následující – Lys64, Lys 66, Thr 189, Asn 292, Arg 294 a Lys311 v rP2X7 (Chataigneau, Lemoine, & Grutter, 2013). Dále, oproti hP2X3 receptoru, je vazebná kapsa užší a solventu méně dostupná, což by mohlo být důvod pro nutnost vysoké koncentrace ATP k otevření P2X7 kanálu. Další z rozdílů P2X7 oproti hP2X3 v ATP vazebné kapse je absence Ser 275, které je nahrazeno Phe288 v rP2X7 a Tyr 288 v hP2X7 a které v hP2X3 slouží k tvorbě interakce s α fosfátovou skupinou (McCarthy et al., 2019) (Mansoor et al., 2016).

3. 3. 7. Způsob efektu antagonistů

První studie se, jak bylo výše řečeno, věnuje hlavně tomu, jakým způsobem ovlivňují receptor někteří jeho antagonisté (Karasawa & Kawate, 2016b). Zabývá se konkrétně pěti látkami, u nichž je znám jejich inhibiční efekt specifický pro P2X7, a které neovlivňují ostatní P2X receptory, jimiž jsou A740003 (Honore et al., 2006), A804598 (Donnelly-Roberts et al., 2009), AZ10606120 (Michel et al., 2007), GW791343 (Michel, Chambers, & Walter, 2008) (Michel, Clay, et al., 2008), JNJ47965567 (Anindya Bhattacharya et al., 2013). Bylo zjištěno, že všech těchto 5 sloučenin, ač si nejsou strukturně podobné, se váže na stejné nebo velmi podobné místo v P2X7 receptoru, které

sousedí s ATP vazebnou kapsou. Toto místo, je obklopeno třinácti aminokyselinami pocházejícími ze tří β -vláken, jimiž jsou $\beta 4$, $\beta 13$, $\beta 14$. Vazba antagonisty je zprostředkovávána hlavně hydrofobními interakcemi, obzvláště pak hlouběji v prohlubni vazebného místa, přičemž se na vazbě podílejí hlavně Phe88, Phe95, Phe103, Met105, Phe293, a Val312, z čehož Phe103 má největší vliv na inhibiční efekt těchto antagonistů. Tyto látky účinkují na receptor jako jeho alosterické inhibitory, ač v předchozích studiích byly tři z nich určeny jako kompetitivní inhibitory, konkrétně se jedná o A740003, A804598, a JNJ47965567. Mezipodjednotková prohlubeň, do níž se na P2X7 antagonisté váží, je právě u P2X7 daleko širší oproti zbylým dvěma krystalizovaným P2X receptorům (Kawate et al., 2009) (Hattori & Gouaux, 2012) (Mansoor et al., 2016), a její část tvořená $\beta 13$ a $\beta 14$ připomíná svým tvarem věžičku. Věžička a antagonistu vazebná kapsa se při vazbě ATP a následných konformačních změnách zužují, proto vazba antagonisty do těchto míst vede k znemožnění tohoto zúžení, čímž brání konformačním změnám nutným k otevření kanálu (Karasawa & Kawate, 2016b).

4. Závěr

Výskyt ATP v extracelulárním prostoru, jeho fyziologická funkce v mezibuněčné signalizaci, a především existence purinergních P2X receptorů může být pro někoho překvapivým jevem. ATP je stále vnímán jako specifická intracelulární molekula, která plní pouze jednu specifickou funkci, tj. být hlavním energetickým oběživem buňky. Dvacet pět let poté, co byl naklonován první P2X receptor, však porozumění purinergní signalizaci, molekulární struktury a fyziologické funkci těchto receptorů udělalo velký pokrok. Jisté je, že se ATP může dostat mimo buňku, aniž by při tomto pochodu došlo k ohrožení životaschopnosti buňky. Ví se, že všechny P2X receptory mají podobnou terciární strukturu a do jisté míry obdobné chování v rámci změn konformace. Vazebné místo pro ligand se u všech těchto receptorů nachází v extracelulární doméně na podobném místě, neobsahuje žádné kanonické vazebné motivy nalezené v jiných proteinech, které spolupracují s intracelulárním ATP, a aminokyseliny důležité pro vazbu extracelulárního ATP jsou u všech P2X receptorů téměř identické. Většina krystalových struktur přičítá stěžejní funkci ve vazbě aminokyselinám Lys 70, Lys72, Asn296, Lys316, Thr189, Leu191, Ile232, Leu217 a Lys293 (číslování podle zfp2X4 receptoru). U hp2X3 receptoru je známo, že ATP navíc interaguje s Phe174 a se Ser275, a ATP vazebná kapsa s rp2X7 se zdá být menší než u hp2X3 a zfp2X4, by by mohl vysvětlovat nižší citlivost P2X7 k ATP. Pravděpodobně nejdůležitější části molekuly ATP jsou kyslíky v trifosfátovém řetězci a-NH₂ skupina na adeninu, důležité je také zachování celkové struktury molekuly ligandu.

Obdobné jsou také rámcové změny konformace TM domén všech podjednotek při otevírání iontového kanálu. Navázáním ATP se mění především konformace TM2, která tvoří stěnu

transmembránového póru, a dochází k otevření iontového kanálu. Póry krystalizovaných P2X receptorů se také podobají fyzikálně chemickými vlastnostmi aminokyselin, které je tvoří. Leu340, Ala344, Ala347, Leu351 a Ile355 lemují otevřený pór P2X4 receptoru, jehož hranice leží na Ala347 a Leu351 v otevřeném stavu a na Leu340 and Ala347 ve stavu uzavřeném (číslování podle zP2X4 receptoru). U hP2X3 je tato hranice určena Ile323 a Thr330, které odpovídají stejným pozicím uvedeným pro zP2X4 v uzavřeném stavu, Ile323 a Val326 v otevřeném stavu a v desenzitizovaném stavu je kanál uzavřen Val334, přičemž pór hP2X3 je lemován Ile323, Val326, Thr330, a Val334. U rP2X7 je hranice póru na Ser339 a Ser342 v otevřeném stavu a v uzavřeném stavu je pór lemován Gln332, Val335, Ser339, a Ser342.

Krystalové struktury ukázaly nové a nečekané prvky v terciální stavbě P2X receptorů a objasnili mnoho jejich funkčních vlastností. Mezi důležité strukturní prvky objevené v krystalizovaných strukturách patří extracelulární vestibul s fenestracemi pro akumulaci a vstup iontů, cytoplasmatická čepička poprvé nalezená u hP2X3, která částečně objasňuje desenzitizaci nebo její absenci, C-cys kotva, která objasňuje vliv palmitoylace P2X7 a cytoplasmatický balast tvořený dlouhým C-koncem P2X7, o němž je známo, že obsahuje důležité signalizační prvky.

Očekává se, že vyřešení krystalových struktur ostatních P2X receptorů (P2X1 P2X2, P2X5 a P2X6), a krystalizace receptorů v komplexu s jinými agonisty, antagonisty a alosterickými modulátory může vést k odhalení nových dosud neprobádaných molekulárních oblastí a jevů, a objasní souvislosti mezi strukturami a funkcemi, které nám dosud byly utajeny, a mohly by pomoci při léčbě lidských onemocnění.

5. Bibliografie

- Abbracchio, M. P., Burnstock, G., Verkhratsky, A., & Zimmermann, H. (2009). Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends in Neurosciences*, 32(1), 19–29. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.10.001>
- Alejandro, M., Paloma, M. G., Carlos Matute, & Maria Domercq. (2020). Contribution of P2X4 receptors to CNS function and pathophysiology. *International Journal of Molecular Sciences*, 1–15. <https://doi.org/10.3390/ijms21155562>
- Allsopp, R. C., & Evans, R. J. (2015). Contribution of the juxtatransmembrane intracellular regions to the time course and permeation of ATP-gated P2X7 Receptor Ion Channels. *Journal of Biological Chemistry*, 290(23), 14556–14566. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.642033>
- Ase, A. R., Therrien, É., & Séguéla, P. (2019). An allosteric inhibitory site conserved in the ectodomain of P2X receptor channels. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13(April), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00121>
- Bannas, P., Adriouch, S., Kahl, S., Braasch, F., Haag, F., & Koch-Nolte, F. (2005). Activity and specificity of toxin-related mouse T cell ecto-ADP- ribosyltransferase ART2.2 depends on its

association with lipid rafts. *Blood*, 105(9), 3663–3670. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-08-3325>

- Bhattacharya, Anindya, Wang, Q., Ao, H., Shoblock, J. R., Lord, B., Aluisio, L., ... Letavic, M. A. (2013). Pharmacological characterization of a novel centrally permeable P2X7 receptor antagonist: JNJ-47965567. *British Journal of Pharmacology*, 170(3), 624–640. <https://doi.org/10.1111/bph.12314>
- Bhattacharya, Anirban, Vavra, V., Svobodova, I., Bendova, Z., Vereb, G., & Zemkova, H. (2013). Potentiation of inhibitory synaptic transmission by extracellular ATP in rat suprachiasmatic nuclei. *Journal of Neuroscience*, 33(18), 8035–8044. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4682-12.2013>
- Bianchi, B. R., Lynch, K. J., Touma, E., Niforatos, W., Burgard, E. C., Alexander, K. M., ... Van Biesen, T. (1999). Pharmacological characterization of recombinant human and rat P2X receptor subtypes. *European Journal of Pharmacology*, 376(1–2), 127–138. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(99\)00350-7](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(99)00350-7)
- Blake, C. C. F., Geisow, M. J., Oatley, S. J., Rérat, B., & Rérat, C. (1978). Structure of prealbumin: Secondary, tertiary and quaternary interactions determined by Fourier refinement at 1.8 Å. *Journal of Molecular Biology*, 121(3), 339–356. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(78\)90368-6](https://doi.org/10.1016/0022-2836(78)90368-6)
- Bodnar, M., Wang, H., Riedel, T., Hintze, S., Kato, E., Fallah, G., ... Rubini, P. (2011). Amino acid residues constituting the agonist binding site of the human P2X3 receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 286(4), 2739–2749. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.167437>
- Browne, L. E., Cao, L., Broomhead, H. E., Bragg, L., Wilkinson, W. J., & North, R. A. (2011). P2X receptor channels show threefold symmetry in ionic charge selectivity and unitary conductance. *Nature Neuroscience*, 14(1), 17–18. <https://doi.org/10.1038/nn.2705>
- Buell, G., Lewis, C., Collo, G., North, R. A., & Surprenant, A. (1996). An antagonist-insensitive P2X receptor expressed in epithelia and brain. *EMBO Journal*, 15(1), 55–62. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb00333.x>
- Burgard, E. C., Niforatos, W., Van Biesen, T., Lynch, K. J., Kage, K. L., Touma, E., ... Jarvis, M. F. (2000). Competitive antagonism of recombinant P2X(2/3) receptors by 2',3'-O-(2,4,6-trinitrophenyl) adenosine 5'-triphosphate (TNP-ATP). *Molecular Pharmacology*, 58(6), 1502–1510. <https://doi.org/10.1124/mol.58.6.1502>
- Burnstock, G., & Verkhratsky, A. (2012). Purinergic signalling and the nervous system. In *Purinergic Signalling and the Nervous System* (Vol. 9783642288). <https://doi.org/10.1007/978-3-642-28863-0>
- Cavarelli, J., Eriani, G., Rees, B., Ruff, M., Boeglin, M., Mitschler, A., ... Moras, D. (1994). The active site of yeast aspartyl-tRNA synthetase: Structural and functional aspects of the aminoacylation reaction. *EMBO Journal*, 13(2), 327–337. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06265.x>

- Chataigneau, T., Lemoine, D., & Grutter, T. (2013). Exploring the ATP-binding site of P2X receptors. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7(DEC), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00273>
- Chen, C. C., Akopian, A. N., Sivilotti, L., Colquhoun, D., Burnstock, G., & Wood, J. N. (1995). A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. *Nature*, Vol. 377, pp. 428–431. <https://doi.org/10.1038/377428a0>
- Clyne, J. D., Wang, L. F., & Hume, R. I. (2002). Mutational Analysis of the Conserved Cysteines of the Rat P2X2 Purinoceptor. *Journal of Neuroscience*, 22(10), 3873–3880. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-10-03873.2002>
- Collo, G., North, R. A., Kawashima, E., Merlo-Pich, E., Neidhart, S., Surprenant, A., & Buell, G. (1996). Cloning of P2X5 and P2X6 receptors and the distribution and properties of an extended family of ATP-gated ion channels. *Journal of Neuroscience*, 16(8), 2495–2507. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.16-08-02495.1996>
- Cook, S. P., Vulchanova, L., Hargreaves, K. M., Elde, R., & McCleskey, E. W. (1997). Distinct ATP receptors on pain-sensing and stretch-sensing neurons. *Nature*, Vol. 387, pp. 505–508. <https://doi.org/10.1038/387505a0>
- Degrève, L., Vecchi, S. M., & Junior, C. Q. (1996). The hydration structure of the Na⁺ and K⁺ ions and the selectivity of their ionic channels. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1274(3), 149–156. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(96\)00019-9](https://doi.org/10.1016/0005-2728(96)00019-9)
- Denlinger, L. C., Fisette, P. L., Sommer, J. A., Watters, J. J., Prabhu, U., Dubyak, G. R., ... Bertics, P. J. (2001). Cutting Edge: The Nucleotide Receptor P2X 7 Contains Multiple Protein- and Lipid-Interaction Motifs Including a Potential Binding Site for Bacterial Lipopolysaccharide . *The Journal of Immunology*, 167(4), 1871–1876. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.4.1871>
- Denlinger, L. C., Sommer, J. A., Parker, K., Gudipaty, L., Fisette, P. L., Watters, J. W., ... Bertics, P. J. (2003). Mutation of a Dibasic Amino Acid Motif Within the C Terminus of the P2X 7 Nucleotide Receptor Results in Trafficking Defects and Impaired Function . *The Journal of Immunology*, 171(3), 1304–1311. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.3.1304>
- Donnelly-Roberts, D. L., Namovic, M. T., Surber, B., Vaidyanathan, S. X., Perez-Medrano, A., Wang, Y., ... Jarvis, M. F. (2009). [3H]A-804598 ([3H]2-cyano-1-[(1S)-1-phenylethyl]-3-quinolin-5-ylguanidine) is a novel, potent, and selective antagonist radioligand for P2X7 receptors. *Neuropharmacology*, 56(1), 223–229. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.06.012>
- Elliott, J. I., Surprenant, A., Marelli-Berg, F. M., Cooper, J. C., Cassady-Cain, R. L., Wooding, C., ... Higgins, C. F. (2005). Membrane phosphatidylserine distribution as a non-apoptotic signalling mechanism in lymphocytes. *Nature Cell Biology*, 7(8), 808–816. <https://doi.org/10.1038/ncb1279>
- Ennion, S., Hagan, S., & Evans, R. J. (2000). The role of positively charged amino acids in ATP recognition by human P2X1 receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 275(38), 29361–29367. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003637200>

- Ennion, S. J., & Evans, R. J. (2002). Conserved cysteine residues in the extracellular loop of the human P2X1 receptor form disulfide bonds and are involved in receptor trafficking to the cell surface. *Molecular Pharmacology*, *61*(2), 303–311. <https://doi.org/10.1124/mol.61.2.303>
- Finger, T. E., Danilova, V., Barrows, J., Bartel, D. L., Vigers, A. J., Stone, L., ... Kinnamon, S. C. (2005). Neuroscience: ATP signalling is crucial for communication from taste buds to gustatory nerves. *Science*, *310*(5753), 1495–1499. <https://doi.org/10.1126/science.1118435>
- Fujiwara, Y., Keceli, B., Nakajo, K., & Kubo, Y. (2009). Voltage-and [ATP]-dependent gating of the P2X₂ ATP receptor channel. *Journal of General Physiology*, *133*(1), 93–109. <https://doi.org/10.1085/jgp.200810002>
- Garcia-Guzman, M., Soto, F., Gomez-Hernandez, J. M., Lund, P. E., & Stühmer, W. (1997). Characterization of recombinant human P2X₄ receptor reveals pharmacological differences to the rat homologue. *Molecular Pharmacology*, *51*(1), 109–118. <https://doi.org/10.1124/mol.51.1.109>
- Gever, J. R., Cockayne, D. A., Dillon, M. P., Burnstock, G., & Ford, A. P. D. W. (2006). Pharmacology of P2X channels. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, *452*(5), 513–537. <https://doi.org/10.1007/s00424-006-0070-9>
- Giniatullin, R., & Nistri, A. (2013). Desensitization properties of P2X₃ receptors shaping pain signaling. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *7*(DEC), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00245>
- Gonnord, P., Delarasse, C., Auger, R., Benihoud, K., Prigent, M., Cuif, M. H., ... Kanellopoulos, J. M. (2009). Palmitoylation of the P2X₇ receptor, an ATP-gated channel, controls its expression and association with lipid rafts. *The FASEB Journal*, *23*(3), 795–805. <https://doi.org/10.1096/fj.08-114637>
- Gonzales, E. B., Kawate, T., & Gouaux, E. (2009). Pore architecture and ion sites in acid-sensing ion channels and P2X receptors. *Nature*, *460*(7255), 599–604. <https://doi.org/10.1038/nature08218>
- Grubb, B. D. (1999). Characterization of cultured dorsal root ganglion neuron P2X receptors. *European Journal of Neuroscience*, *11*(1), 149–154. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1999.00426.x>
- Gu, B. J., Rathsam, C., Stokes, L., McGeachie, A. B., & Wiley, J. S. (2009). Extracellular ATP dissociates nonmuscle myosin from P2X₇ complex: This dissociation regulates P2X₇ pore formation. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, *297*(2). <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00079.2009>
- Hattori, M., & Gouaux, E. (2012). Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors. *Nature*, *485*(7397), 207–212. <https://doi.org/10.1038/nature11010>
- Hausmann, R., Bahrenberg, G., Kuhlmann, D., Schumacher, M., Braam, U., Bieler, D., ... Schmalzing, G. (2014). A hydrophobic residue in position 15 of the rP2X₃ receptor slows desensitization and reveals properties beneficial for pharmacological analysis and high-

throughput screening. *Neuropharmacology*, 79, 603–615.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.01.010>

- Honore, P., Donnelly-roberts, D., Namovic, M. T., Hsieh, G., Zhu, C. Z., Mikusa, J. P., ... Jarvis, M. F. (2006). A-740003 [N-(1-[(cyanoimino)(5-quinolinylamino) methyl]amino)-2,2-dimethylpropyl)-2-(3,4-dimethoxyphenyl)acetamide], a novel and selective P2X7 receptor antagonist, dose-dependently reduces neuropathic pain in the rat. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 319(3), 1376–1385.
<https://doi.org/10.1124/jpet.106.111559>
- Jarvis, M. F., Burgard, E. C., McGaraughty, S., Honore, P., Lynch, K., Brennan, T. J., ... Faltynek, C. (2002). A-317491, a novel potent and selective non-nucleotide antagonist of P2X3 and P2X2/3 receptors, reduces chronic inflammatory and neuropathic pain in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(26), 17179–17184.
<https://doi.org/10.1073/pnas.252537299>
- Jiang, L. H., Rassendren, F., Surprenant, A., & North, R. A. (2000). Identification of amino acid residues contributing to the ATP-binding site of a purinergic P2X receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 275(44), 34190–34196. <https://doi.org/10.1074/jbc.M005481200>
- Karasawa, A., & Kawate, T. (2016a). Structural basis for subtype-specific inhibition of the P2X7 receptor. *ELife*, 5, 1–17. <https://doi.org/10.7554/elife.22153>
- Karasawa, A., & Kawate, T. (2016b). Structural basis for subtype-specific inhibition of the P2X7 receptor. *ELife*, 5. <https://doi.org/10.7554/elife.22153>
- Kawate, T., Michel, J. C., Birdsong, W. T., & Gouaux, E. (2009). Crystal structure of the ATP-gated P2X4 ion channel in the closed state. *Nature*, 460(7255), 592–598.
<https://doi.org/10.1038/nature08198>
- Khakh, B. S. (2001). Molecular physiology of p2x receptors and atp signalling at synapses. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(3), 165–174. <https://doi.org/10.1038/35058521>
- Khakh, B. S., Bao, X. R., Labarca, C., & Lester, H. A. (1999). Neuronal P2X transmitter-gated cation channels change their ion selectivity in seconds. *Nature Neuroscience*, 2(4), 322–330.
<https://doi.org/10.1038/7233>
- Khmyz, V., Maximyuk, O., Teslenko, V., Verkhatsky, A., & Krishtal, O. (2008). P2X3 receptor gating near normal body temperature. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 456(2), 339–347. <https://doi.org/10.1007/s00424-007-0376-2>
- Kim, M., Jiang, L., Wilson, H. L., North, R. A., & Surprenant, A. (2001). Proteomic and functional evidence for a P2X7 receptor signalling complex. *EMBO Journal*, 20(22), 6347–6358.
- Kochańczyk, T., Drozd, A., & Kręzel, A. (2015). Relationship between the architecture of zinc coordination and zinc binding affinity in proteins - Insights into zinc regulation. *Metallomics*, 7(2), 244–257. <https://doi.org/10.1039/c4mt00094c>
- Kopp, R., Krautloher, A., Ramírez-Fernández, A., & Nicke, A. (2019). P2X7 Interactions and Signaling – Making Head or Tail of It. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 12(August), 1–25.
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00183>

- Kozik, P., Francis, R. W., Seaman, M. N. J., & Robinson, M. S. (2010). A Screen for Endocytic Motifs. *Traffic*, 11(6), 843–855. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2010.01056.x>
- Krishtal, O. A., Marchenko, S. M., & Pidoplichko, V. I. (1983). Receptor for ATP in the membrane of mammalian sensory neurones. *Neuroscience Letters*, 35(1), 41–45. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(83\)90524-4](https://doi.org/10.1016/0304-3940(83)90524-4)
- Lewis, C., Neidhart, S., Holy, C., North, R. A., Buell, G., & Surprenant, A. (1995). Coexpression of P2X2 and P2X3 receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons. *Nature*, Vol. 377, pp. 432–435. <https://doi.org/10.1038/377432a0>
- Linden, J., Koch-Nolte, F., & Dahl, G. (2019). Purine Release, Metabolism, and Signaling in the Inflammatory Response. *Annual Review of Immunology*, 37, 325–347. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-051116-052406>
- Luo, J., Yin, G. F., Gu, Y. Z., Liu, Y., Dai, J. P., Li, C., & Li, Z. W. (2006). Characterization of three types of ATP-activated current in relation to P2X subunits in rat trigeminal ganglion neurons. *Brain Research*, 1115(1), 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.07.084>
- MacKenzie, A., Wilson, H. L., Kiss-Toth, E., Dower, S. K., North, R. A., & Surprenant, A. (2001). Rapid secretion of interleukin-1 β by microvesicle shedding. *Immunity*, 15(5), 825–835. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00229-1](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00229-1)
- Mansoor, S. E., Lü, W., Oosterheert, W., Shekhar, M., Tajkhorshid, E., & Gouaux, E. (2016). X-ray structures define human P2X 3 receptor gating cycle and antagonist action. *Nature*, 538(7623), 66–71. <https://doi.org/10.1038/nature19367>
- Marquez-Klaka, B., Rettinger, J., Bhargava, Y., Eisele, T., & Nicke, A. (2007). Identification of an intersubunit cross-link between substituted cysteine residues located in the putative ATP binding site of the P2X1 receptor. *Journal of Neuroscience*, 27(6), 1456–1466. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3105-06.2007>
- McCarthy, A. E., Yoshioka, C., & Mansoor, S. E. (2019). Full-Length P2X7 Structures Reveal How Palmitoylation Prevents Channel Desensitization. *Cell*, 179(3), 659–670.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.09.017>
- Michel, A. D., Chambers, L. J., Clay, W. C., Condreay, J. P., Walter, D. S., & Chessell, I. P. (2007). Direct labelling of the human P2X 7 receptor and identification of positive and negative cooperativity of binding. *British Journal of Pharmacology*, 151(1), 84–95. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707196>
- Michel, A. D., Chambers, L. J., & Walter, D. S. (2008). Negative and positive allosteric modulators of the P2X 7 receptor. *British Journal of Pharmacology*, 153(4), 737–750. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707625>
- Michel, A. D., Clay, W. C., Ng, S. W., Roman, S., Thompson, K., Condreay, J. P., ... Senger, S. (2008). Identification of regions of the P2X 7 receptor that contribute to human and rat species differences in antagonist effects. *British Journal of Pharmacology*, 155(5), 738–751. <https://doi.org/10.1038/bjp.2008.306>

- Migita, K., Haines, W. R., Voigt, M. M., & Egan, T. M. (2001). Polar Residues of the Second Transmembrane Domain Influence Cation Permeability of the ATP-gated P2X2 Receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 276(33), 30934–30941. <https://doi.org/10.1074/jbc.M103366200>
- Murrell-Lagnado, R. D. (2018). A role for P2X4 receptors in lysosome function. *Journal of General Physiology*, 150(2), 185–187. <https://doi.org/10.1085/jgp.201711963>
- North, R. A. (2002). Molecular physiology of P2X receptors. *Physiological Reviews*, 82(4), 1013–1067. <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2002>
- Roberts, J. A., & Evans, R. J. (2004). ATP binding at human P2X1 receptors: Contribution of aromatic and basic amino acids revealed using mutagenesis and partial agonists. *Journal of Biological Chemistry*, 279(10), 9043–9055. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308964200>
- Roberts, J. A., & Evans, R. J. (2006). Contribution of conserved polar glutamine, asparagine and threonine residues and glycosylation to agonist action at human P2X1 receptors for ATP. *Journal of Neurochemistry*, 96(3), 843–852. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03593.x>
- Robinson, L. E., Shridar, M., Smith, P., & Murrell-Lagnado, R. D. (2014). Plasma membrane cholesterol as a regulator of human and rodent P2X7 receptor activation and sensitization. *Journal of Biological Chemistry*, 289(46), 31983–31994. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.574699>
- Roger, S., Gillet, L., Baroja-Mazo, A., Surprenant, A., & Pelegrin, P. (2010). C-terminal calmodulin-binding motif differentially controls human and rat P2X7 receptor current facilitation. *Journal of Biological Chemistry*, 285(23), 17514–17524. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.053082>
- Roger, S., Pelegrin, P., & Surprenant, A. (2008). Facilitation of P2X7 receptor currents and membrane blebbing via constitutive and dynamic calmodulin binding. *Journal of Neuroscience*, 28(25), 6393–6401. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0696-08.2008>
- Sawada, K., Echigo, N., Juge, N., Miyaji, T., Otsuka, M., Omote, H., ... Moriyama, Y. (2008). Identification of a vesicular nucleotide transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(15), 5683–5686. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800141105>
- Schmid, R., & Evans, R. J. (2019). ATP-Gated P2X Receptor Channels: Molecular Insights into Functional Roles. *Annual Review of Physiology*, 81(October 2018), 43–62. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-020518-114259>
- Schneider, M., Prudic, K., Pippel, A., Klapperstück, M., Braam, U., Müller, C. E., ... Markwardt, F. (2017). Interaction of purinergic P2X4 and P2X7 receptor subunits. *Frontiers in Pharmacology*, 8(NOV), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00860>
- Schulte, G., & Fredholm, B. B. (2003). Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases. *Cellular Signalling*, 15(9), 813–827. [https://doi.org/10.1016/S0898-6568\(03\)00058-5](https://doi.org/10.1016/S0898-6568(03)00058-5)

- Shibuya, I., Tanaka, K., Hattori, Y., Uezono, Y., Harayama, N., Noguchi, J., ... Yamashita, H. (1999). Evidence that multiple P2X purinoceptors are functionally expressed in rat supraoptic neurones. *Journal of Physiology*, 514(2), 351–367. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1999.351ae.x>
- Smart, M. L., Gu, B., Panchal, R. G., Wiley, J., Cromer, B., Williams, D. A., & Petrou, S. (2003). P2X7 receptor cell surface expression and cytolytic pore formation are regulated by a distal C-terminal region. *Journal of Biological Chemistry*, 278(10), 8853–8860. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211094200>
- Smith, F. M., Humphrey, P. P. A., & Murrell-Lagnado, R. D. (1999). Identification of amino acids within the P2X2 receptor C-terminus that regulate desensitization. *Journal of Physiology*, 520(1), 91–99. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1999.00091.x>
- Soto, F., Garcia-Guzman, M., Gomez-Hernandez, J. M., Hollmann, M., Karschin, C., & Stühmer, W. (1996). P2X4: An ATP-activated ionotropic receptor cloned from rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(8), 3684–3688. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.8.3684>
- Souslova, V., Cesare, P., Ding, Y., Akopian, A. N., Stanfa, L., Suzuki, R., ... Wood, J. N. (2000). Warm-coding deficits and aberrant inflammatory pain in mice lacking P2X3 receptors. *Nature*, 407(6807), 1015–1017. <https://doi.org/10.1038/35039526>
- Stoop, R., Surprenant, A., & North, R. A. (1997). Different sensitivities to pH of ATP-induced currents at four cloned P2X receptors. *Journal of Neurophysiology*, 78(4), 1837–1840. <https://doi.org/10.1152/jn.1997.78.4.1837>
- Surprenant, A., Rassendren, F., Kawashima, E., North, R. A., & Buell, G. (1996). The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science*, 272(5262), 735–738. <https://doi.org/10.1126/science.272.5262.735>
- Teresa Miras-Portugal, P. M., Sebastián-Serrano, Á., De Diego García, L., & Díaz-Hernández, M. (2017). Neuronal P2X7 receptor: Involvement in neuronal physiology and. *Journal of Neuroscience*, 37(30), 7063–7072. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3104-16.2017>
- Vavra, V., Bhattacharya, A., & Zemkova, H. (2011). Facilitation of glutamate and GABA release by P2X receptor activation in supraoptic neurons from freshly isolated rat brain slices. *Neuroscience*, 188, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.04.067>
- Virginio, C., Mackenzie, A., North, R. A., & Surprenant, A. (1999). Kinetics of cell lysis, dye uptake and permeability changes in cells expressing the rat P2X7 receptor. *Journal of Physiology*, 519(2), 335–346. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1999.0335m.x>
- Virginio, C., MacKenzie, A., Rassendren, F. A., North, R. A., & Surprenant, A. (1999). Pore dilation of neuronal P2X receptor channels. *Nature Neuroscience*, 2(4), 315–321. <https://doi.org/10.1038/7225>
- Virginio, Caterina, North, R. A., & Surprenant, A. (1998). Calcium permeability and block at homomeric and heteromeric P2X2 and P2X3 receptors, and P2X receptors in rat nodose

neurones. *Journal of Physiology*, 510(1), 27–35. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1998.027bz.x>

- Virginio, Caterina, Robertson, G., Surprenant, A., & North, R. A. (1998). Trinitrophenyl-substituted nucleotides are potent antagonists selective for P2X₁, P2X₃, and heteromeric P2X_(2/3) receptors. *Molecular Pharmacology*, 53(6), 969–973.
- Vulchanova, L., Arvidsson, U., Riedl, M., Wang, J., Buell, G., Surprenant, A., ... Elde, R. (1996). Differential distribution of two ATP-gated ion channels (P2X receptors) determined by immunocytochemistry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(15), 8063–8067. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.15.8063>
- Vulchanova, L., Riedl, M. S., Shuster, S. J., Buell, G., Surprenant, A., North, R. A., & Elde, R. (1997). Immunohistochemical study of the P2X₂ and P2X₃ receptor subunits in rat and monkey sensory neurons and their central terminals. *Neuropharmacology*, 36(9), 1229–1242. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(97\)00126-3](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(97)00126-3)
- Watters, J. J., Sommer, J. A., Fisette, P. L., Pfeiffer, Z. A., Aga, M., Prabhu, U., ... Bertics, P. J. (2001). Macrophage Signaling and Mediator Production. *Drug Development Research*, 104, 91–104.
- Wheeler-Schilling, T. H., Marquardt, K., Kohler, K., Guenther, E., & Jabs, R. (2001). Identification of purinergic receptors in retinal ganglion cells. *Molecular Brain Research*, 92(1–2), 177–180. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(01\)00160-7](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(01)00160-7)
- Wildman, S. S., King, B. F., & Burnstock, G. (1999a). Modulation of ATP-responses at recombinant rP2X₄ receptors by extracellular pH and zinc. *British Journal of Pharmacology*, 126(3), 762–768. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702325>
- Wildman, S. S., King, B. F., & Burnstock, G. (1999b). Modulatory activity of extracellular H⁺ and Zn²⁺ on ATP-responses at rP2X₁ and rP2X₃ receptors. *British Journal of Pharmacology*, 128(2), 486–492. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702802>
- Wiley, J. S., Sluyter, R., Gu, B. J., Stokes, L., & Fuller, S. J. (2011). The human P2X₇ receptor and its role in innate immunity. *Tissue Antigens*, 78(5), 321–332. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2011.01780.x>
- Wiley, James S., Dao-Ung, L. P., Li, C., Shemon, A. N., Gu, B. J., Smart, M. L., ... Sluyter, R. (2003). An Ile-568 to Asn polymorphism prevents normal trafficking and function of the human P2X₇ receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 278(19), 17108–17113. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212759200>
- Wilkinson, W. J., Jiang, L., Surprenant, A., & North, R. A. (2006). Role of Ectodomain Lysines in the Subunits of the heteromeric P2X_{2/3} receptor. *Molecular Pharmacology*, 70(4), 1159–1163. <https://doi.org/10.1124/mol.106.026658>
- Williams, D. C., Lee, J. Y., Cai, M., Bewley, C. A., & Clore, G. M. (2005). Crystal structures of the HIV-1 inhibitory cyanobacterial protein MVL free and bound to man3GlcNAc₂: Structural basis for specificity and high-affinity binding to the core pentasaccharide from N-linked

oligomannoside. *Journal of Biological Chemistry*, 280(32), 29269–29276.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M504642200>

Xiong, K., Peoples, R. W., Montgomery, J. P., Chiang, Y., Stewart, R. R., Weight, F. F., & Li, C. (1999). Differential modulation by copper and zinc of P2X2 and P2X4 receptor function. *Journal of Neurophysiology*, 81(5), 2088–2094. <https://doi.org/10.1152/jn.1999.81.5.2088>

Zemkova, H., Yan, Z., Liang, Z., Jelinkova, I., Tomic, M., & Stojilkovic, S. S. (2007). Role of aromatic and charged ectodomain residues in the P2X4 receptor functions. *Journal of Neurochemistry*, 102(4), 1139–1150. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04616.x>